

**Einfluss des Ausnehmens auf die sensorische und  
hygienische Beschaffenheit von eisgelagerten Zandern  
(*Sander lucioperca*) und Regenbogenforellen  
(*Oncorhynchus mykiss*)**

DISSERTATION

**zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum agriculturalium  
(Dr. rer. agr.)**

**eingereicht an der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von Dipl. - Oecotroph. Gyopár Sipos  
geboren am 23.01.1974 in Pécs/Ungarn

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät:  
Prof. Dr. Uwe Jens Nagel

Gutachter:

1. Prof. Dr. K. Schreckenbach
2. Prof. Dr. Johannes Krämer
3. Prof. Dr. K. Anwand

eingereicht am: 05.11.2002  
Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2003

Die vorliegende Dissertation entstand am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Berlin. Sie wurde angefertigt mit der freundlichen finanziellen Unterstützung des BMG/BMVEL im Rahmen des Forschungsvorhabens Nr. 1339 137:

"Statuserhebung zum Ausnehmen von Fischen, Prüfung gesundheitlich-hygienischer und technisch-handelsrelevanter Erfordernisse für das Ausnehmen von Fischen einschließlich Untersuchungen zur Auswirkung unterschiedlicher Betäubungsverfahren auf die Fischqualität."

TAGESLOSUNG 24. APRIL 2003:

DER GOTT DES HIMMELS WIRD ES UNS GELINGEN LASSEN; DENN WIR, SEINE KNECHTE, HABEN  
UNS AUFGEMACHT UND BAUEN WIEDER AUF.

*NEHEMLAS 2, 20*

**MEINEN ELTERN ÁGNES UND TIBOR SIPOS**

## ABSTRACT DEUTSCH

Die Bedingungen für die Vermarktung von Fischereierzeugnissen sind streng geregelt. Die Deutsche Fisch-Hygiene-Verordnung (VO) schreibt in den §§ 4 (1) und 6 vor, dass alle Fische unverzüglich nach dem Fang und der Tötung ausgenommen werden müssen. In diesem Punkt ist die deutsche VO strenger als das europäische Gemeinschaftsrecht (RL 91/493/EWG). Sowohl durch die in einzelnen Bundesländern unterschiedliche Auslegung des Begriffes „unverzüglich“ als auch durch die in anderen EU-Ländern erlassenen Vorschriften ergibt sich eine gewisse Rechtsunsicherheit bei der Vermarktung von Ganzfischen. Im Gegensatz zu Seefischen gibt es bei Süßwasserfischen nur wenige Untersuchungen zum Vergleich der sensorischen und hygienischen Parameter von ausgenommen und unausgenommen gelagerten Fischen. Ziel der Untersuchungen war es daher, an den zwei Modellfischarten Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und Ostsee-Zander (*Sander lucioperca*) gesundheitlich-hygienische als auch qualitative Gründe für bzw. gegen das Ausnehmen von Süßwasserfischen zu ermitteln. Zum einen wurde während der Lagerung bis zum Verderb wiederholt der Keimstatus der Fische bestimmt, wobei sowohl die Verderbsorganismen als auch potentiell humanpathogene Keime (*Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp.) im Fischgewebe erfasst wurden. Zum anderen wurden fischartspezifische Frischegrad- und Kochprobenschemata entwickelt, die den Verderbsprozessen der beiden Süßwasserfischarten während der Lagerung angepasst sind und für eine Bestimmung der sensorischen Eigenschaften angewendet werden können. Darüber hinaus erfolgte bei den Zandern eine Untersuchung der Muskulatur und der Eingeweide auf einen Befall mit humapathogenen Nematoden und eine Bestimmung von flüchtigen Basenstickstoff (TVB-N) in der Filetmuskulatur. Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass unausgenommene Fische, sofern eine optimale Lagerung gewährleistet ist, hygienisch unbedenklich sind und für einen Zeitraum von einigen Tagen qualitativ gleichwertig mit ausgenommenen Fischen bleiben, bevor autolytische Bauchhöhlenprozesse die Qualität des Ganzfisches beeinträchtigen. Dabei hängt der Zeitraum unter anderem von der Fischart und dem Nüchterungsgrad ab. Mikrobiologische Gründe sprechen eher gegen ein frühzeitiges Ausnehmen, da die bakterielle Belastung der Bauchhöhle durch die Schlachtung höher ausfällt als bei unausgenommen gelagerten Fischen. Demnach kann durch ein spätes Ausnehmen zwar ein schnellerer Qualitätsverlust bei Ganzfischen auftreten, aber aus hygienischer Sicht, auch im Zusammenhang mit humanpathogenen Keimen, ist eine erhöhte Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers nicht zu erwarten.

Schlagworte:

Regenbogenforelle

Zander

Süßwasserfische

Sensorik

bakterieller Verderb

autolytischer Verderb

Ausnehmen

Anisakis simplex

## ABSTRACT ENGLISCH

Conditions for the marketing of fishery products are strictly regulated. In Germany, the fish hygiene regulations (§§ 4(1) and 6) demand the gutting of all fishes immediately after the catch. This regulation is more restrictive than the corresponding EU-legislation (RL 91/493/EWG).

But several German counties interpret the term „immediately“ differently, and most other EU-countries have more permitting regulations, thus creating legal ambiguities in the marketing of whole fishes.

Unlike the situation in seafish there are only few surveys in fresh water fish comparing possible sensoric and hygienic effects of gutted and ungutted storage. The aim of this study therefore was to examine health and hygiene related as well as qualitative reasons for or against an immediate gutting of freshwater fish, using aquaculture rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pike-perch (*Sander lucioperca*) from the Baltic Sea as model fish species.

The bacterial load in several tissues of gutted and ungutted fish, spoilage organisms as well as potentially pathogenic bacteria (*Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp), were determined repeatedly throughout the storage period and statistically compared. Furthermore, species-specific grading schemes for the whole fish as well as for steamed fillets were developed that allowed the assessment of spoilage and of the sensoric characteristics of gutted and ungutted fishes. In pike-perch, muscle tissue and guts were examined for pathogenic nematode larvae and the fillet content of total volatile basic nitrogen was determined.

The results of this study lead to the conclusion that ungutted fish, as long as optimal storage conditions are guaranteed, bear no special hygienic risks and keep a quality comparable to gutted fish for at least some days before autolytic processes in the body cavity compromise the quality of the whole fish. The length of this storage period depends mainly on the fish species and the filling of the digestive tract. From a microbiological point of view early gutting is not advisable because the gutting process itself results in a higher bacterial contamination of the body cavity than that found in fish stored ungutted.

Therefore, a later gutting may lead to a faster loss of quality in whole fish but a higher hygienic risk for the consumer, even in connection with bacteria pathogenic for humans, can not be stated.

Keywords:

rainbow trout

pike-perch

fresh-water fish

quality assessment

bacterial spoilage

autolytic spoilage

gutting

Anisakis simplex

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
2.1	ÜBERSICHT: DER VERDERB VON FRISCHFISCH.....	3
2.2	DIE BESTIMMUNG DES FRISCHEGRADES UND DES SENSORISCHEN VERDERBSVERLAUFS .....	4
2.2.1	<i>Der Begriff der Produktqualität bei Fisch</i> .....	4
2.2.2	<i>Der Begriff der Sensorik</i> .....	6
2.2.2.1	Methoden der sensorischen Analyse bei Fischen.....	7
2.2.3	<i>Einfluss der Lagerungsdauer auf sensorische Veränderungen von Fischen</i> .....	11
2.3	MECHANISMEN DES VERDERBS - POSTMORTALE FISCHEIGENE, MIKROBIOLOGISCHE UND CHEMISCHE VERDERBSPROZESSE .....	13
2.3.1	<i>Postmortale Stoffwechselprozesse</i> .....	13
2.3.1.1	Postmortaler pH-Wert und der Rigor mortis .....	13
2.3.1.2	Postmortaler Fett- und Proteinabbau .....	15
2.3.2	<i>Postmortale Veränderungen der Bakterienflora und der bakterielle Verderb</i> .....	17
2.3.2.1	Die Primärflora auf Fischen verschiedener Gewässer .....	18
2.3.2.2	Veränderung der mikrobiologischen Flora während der Lagerung .....	21
2.3.2.3	Bedeutende Verderbniserreger auf Fischen .....	24
2.3.2.3.1	<i>Shewanella putrefaciens</i> .....	25
2.3.2.3.2	<i>Pseudomonas</i> spp.....	26
2.3.3	<i>Chemische Parameter des Verderbs</i> .....	27
2.3.4	<i>Humanpathogene Organismen bei Frischfisch</i> .....	31
2.3.4.1	Übersicht - fakultativ und obligat humanpathogene Bakterien .....	31
2.3.4.2	<i>Vibrio</i> spp. ....	33
2.3.4.3	<i>Aeromonas</i> spp.....	35
2.3.4.4	<i>Pseudomonas</i> spp. ....	37
2.3.4.5	Clostridien .....	37
2.3.4.6	<i>Listeria</i> spp.....	39
2.3.4.7	<i>Enterobacteriaceae</i> .....	41
2.3.4.8	Humanpathogene Parasiten – <i>Anisakis simplex</i> .....	43
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>48</b>
3.1	MATERIAL.....	48
3.1.1	<i>Art und Herkunft, Fang und Schlachtung der Fische</i> .....	48
3.1.1.1	Zander .....	48
3.1.1.2	Regenbogenforellen.....	50
3.1.2	<i>Medien für bakteriologische Untersuchungen</i> .....	52
3.1.3	<i>Reagenzien für die Untersuchung auf Nematoden</i> .....	55
3.1.4	<i>Reagenzien für die Untersuchung auf TVB-N (Methode L 10.00-3, §35 LMBG)</i> .....	55
3.1.5	<i>Teststämme als Kontrollstämme</i> .....	55



3.1.6	<i>Geräte, Instrumente, Zubehör bakteriologische und sensorische Untersuchungen</i>	56
3.2	METHODIK	57
3.2.1	<i>Transport und Lagerungsbedingungen der Fische</i>	57
3.2.1.1	Ostseezander	57
3.2.1.2	Regenbogenforellen	57
3.2.2	<i>Sensorische Untersuchungen durch Frischegrad-Bestimmung und Kochprobe</i>	58
3.2.2.1	Überblick	58
3.2.2.2	Frischegrad-Bestimmung und Kochprobe bei Regenbogenforellen	58
3.2.2.3	Frischegrad-Bestimmung und Kochprobe bei Zander	65
3.2.3	<i>Probenentnahme für bakteriologische, chemische und parasitologische Untersuchungen</i>	69
3.2.3.1	Probenentnahme bei Zandern	69
3.2.3.2	Probenentnahme bei Regenbogenforellen	71
3.2.4	<i>Mikrobiologische Untersuchungen</i>	73
3.2.4.1	Probenaufbereitung für die mikrobiologische Untersuchung	75
3.2.4.2	Quantitativer Nachweis der Verderbniserreger	76
3.2.4.2.1	Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl (GKZ)	78
3.2.4.2.2	Nachweis der Pseudomonaden	79
3.2.4.2.3	Nachweis der Shewanellen bei Zandern	79
3.2.4.3	Nachweis von potentiell humanpathogenen Keimen und Indikatorkeimen	80
3.2.4.3.1	Nachweis von Enterobacteriaceae	80
3.2.4.3.2	Nachweis von Salmonellen	81
3.2.4.3.3	Nachweis von Vibrionen und Aeromonaden	82
3.2.4.3.4	Nachweis von Clostridien	84
3.2.4.3.5	Nachweis von Listerien	85
3.2.5	<i>Untersuchungen auf Nematoden bei Ostseezandern</i>	86
3.2.5.1	Verdau der Eingeweide	86
3.2.5.2	Fluoreszenzmethode bei Fischfilets und Bauchlappen	86
3.2.6	<i>Untersuchung der Filets auf flüchtige Basenstickstoffe (TVB-N)</i>	86
3.2.6.1	Aufschluss der Muskelproben mit 6 %-iger Perchlorsäure (saurer Extrakt)	86
3.2.6.2	Bestimmung des TVB-N-Gehaltes der Proben durch Wasserdampfdestillation	87
4	<b>ERGEBNISSE</b>	89
4.1	ÜBERBLICK	89
4.2	REGENBOGENFORELLEN	89
4.2.1	<i>Frischegradbeurteilung des gesamten Fisches und sensorische Beurteilung der Filets durch eine Kochprobe</i>	89
4.2.1.1	Beurteilung des Frischegrades	90
4.2.1.2	Sensorische Beurteilung der Filets durch die Kochprobe	95
4.2.2	<i>Mikrobiologische Bewertung der Haut, der Rückenmuskulatur, des Darmes und der Bauchlappenmuskulatur</i>	98
4.2.2.1	Verderbniserreger	99
4.2.2.2	Humanpathogene und Indikatorkeime	108

4.3	ZANDER .....	113
4.3.1	<i>Frischegradbeurteilung des gesamten Fisches und sensorische Beurteilung der Filets</i> .....	113
4.3.1.1	Beurteilung des Frischegrades .....	113
4.3.1.2	Sensorische Beurteilung der Filets .....	115
4.3.2	<i>Mikrobiologische Parameter auf der Haut, in der Rückenmuskulatur, im Darm und in der Bauchlappenmuskulatur</i> .....	119
4.3.2.1	Verderbniserreger (aerobe GKZ, Shewanellen und Pseudomonaden) .....	119
4.3.2.2	Humanpathogene und Indikatorkeime .....	123
4.3.3	<i>Ergebnisse der Nematodenuntersuchung</i> .....	125
4.3.4	<i>Ergebnisse der TVB-N-Bestimmung</i> .....	128
4.4	VERGLEICH DER MIKROBIOLOGISCHEN BEFUNDE MIT DEN SENSORISCHEN BEURTEILUNGEN BEI REGENBOGENFORELLEN UND ZANDERN .....	129
4.4.1	<i>Regenbogenforellen</i> .....	129
4.4.2	<i>Zander</i> .....	133
5	<b>DISKUSSION</b> .....	135
5.1	DISKUSSION DES MATERIALS SOWIE DER ART UND HERKUNFT DER FISCHE .....	135
5.2	DISKUSSION DER METHODE .....	136
5.2.1	<i>Frischegradbestimmung und Kochprobe</i> .....	136
5.2.2	<i>Bakteriologische Untersuchungen</i> .....	139
5.3	DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....	143
5.3.1	<i>Diskussion der Ergebnisse der Frischegradbestimmung und der sensorischen Beurteilung der Filets durch die Kochprobe</i> .....	143
5.3.2	<i>Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen, Verlauf von GKZ, SSO und Pseudomonaden</i> .....	149
5.3.3	<i>Entwicklung der Keimzahlen der unterschiedlichen mikrobiologischen Taxa</i> .....	156
5.3.4	<i>Diskussion des Zusammenhangs zwischen den mikrobiologischen Befunden und den Ergebnissen der Frischegradbestimmung</i> .....	162
5.3.5	<i>Diskussion der Nematodenproblematik</i> .....	163
5.3.6	<i>Diskussion des Gehaltes an TVB-N in der Zandermuskulatur</i> .....	165
5.4	GESAMTBETRACHTUNG DER DISKUSSION .....	165
6	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	167
7	<b>SUMMARY</b> .....	170
8	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	173
9	<b>GESETZE UND NORMEN</b> .....	197
10	<b>ANHANG</b> .....	199

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: ENTWICKLUNG DER GESAMTKEIMZAHL (GKZ), DER SPEZIFISCHEN VERDERBSKEIME (SSO, SPECIFIC SPOILAGE ORGANISM) UND DES CHEMISCHEN VERDERBSINDIKATORS TRIMETHYLAMIN (TMA) IN FISCHEN WÄHREND DER EISLAGERUNG (MODIFIZIERT NACH GRAM, 1996). .....	23
ABBILDUNG 2: ENTWICKLUNG DER KEIMZAHL SOWIE DES GEHALTES VON TMA UND EINZELNER STICKSTOFFBASEN IN MG STICKSTOFF JE 100 G BEI DER EISLAGERUNG VON DORNHAI (NACH TÜLSNER, 1994). .....	30
ABBILDUNG 3: RUNDER BAUCHSCHNITT BEI DER ENTNAHME DER DARM- UND DER BAUCHLAPPENPROBEN, SCHNITTSTELLE (.....) .....	70
ABBILDUNG 4: FRISCHEGRAD-VERLAUF VON AUSGENOMMENEN (LINKS) UND NICHT AUSGENOMMENEN (RECHTS) FORELLEN, GESAMTBEURTEILUNG (MITTELWERTE) DER GRUPPEN 1 BIS 4 IM WINTER 1999, V = VERSUCH .....	91
ABBILDUNG 5: VERGLEICH DER ENTWICKLUNG DES FRISCHEGRADES BEI AUSGENOMMENEN UND NICHT AUSGENOMMENEN REGENBOGENFORELLEN, ZUSAMMENFASSUNG DER 4 VERSUCHSGRUPPEN IM WINTER 1999 (MITTELWERTE DER PUNKTEBEWERTUNG). BEWERTUNG DES FRISCHEGRADES: 9 = KLASSE EXTRA; 4 = BC, GRENZE DER VERKEHRSFÄHIGKEIT; < 4 = KLASSE C, VERDORBEN. ....	92
ABBILDUNG 6: FRISCHEGRADVERLAUF (FG) VON LEEREN UND RUNDEN REGENBOGENFORELLEN AUS DER KREISLAUFANLAGE, HERBSTUNTERSUCHUNGEN 2000, GRUPPENMITTELWERT, JE 5 AUSGENOMMENE UND RUNDE FISCHE; TAG 7 UND 9 NÜCHTERN: JE 10 FISCHE .....	95
ABBILDUNG 7: SENSORISCHE KOCHPROBEN-BEWERTUNG (KP) DER REGENBOGENFORELLEN- FILETS AUS DER KREISLAUFANLAGE, HERBSTUNTERSUCHUNGEN 2000 (VERSUCHE 1 BIS 3) JEWEILS MITTELWERTE, NÜCHTERNE (N = 30 LEER, 30 RUND), GEFÜTTERTE (N = 15 LEER, 15 RUND) FISCHE .....	97
ABBILDUNG 8: FRISCHEGRADVERLAUF (FG) UND KOCHPROBEN-UNTERSUCHUNG (KP) VON REGENBOGENFORELLEN-FILETS AUS DER KREISLAUFANLAGE, HERBSTUNTERSUCHUNGEN 2000; JEWEILS MITTELWERTE, NÜCHTERNE (N = 30 LEER, 30 RUND), GEFÜTTERTE (N = 15 LEER, 15 RUND), KP RUND UND LEER ZUSAMMENGEFASST DA NICHT VERSCHIEDEN .....	98
ABBILDUNG 9: VERGLEICH DES AEROBEN GESAMTKEIMZahlVERLAUFES AUF DER HAUT VON AUSGENOMMENEN UND NICHT AUSGENOMMENEN FORELLEN IM WINTER 1999 (20 LEERE UND 20 RUNDE FISCHE PRO TAG) UND IM SOMMER 2001 (5 LEERE UND 5 RUNDE FISCHE PRO TAG), W = WINTER; S = SOMMER; HL = HAUT LEER; HR = HAUT RUND .....	101
ABBILDUNG 10: VERGLEICH AEROBE GESAMTKEIMZAHL (GKZ) UND PSEUDOMONADEN-KEIMZAHL (PS) AUF DER HAUT VON FORELLEN, WINTERVERSUCHE 1999; MITTELWERT ALLER 4 GRUPPEN; N = 20 .....	102
ABBILDUNG 11: VERLAUF DER AEROBEN GESAMTKEIMZAHLEN IM DARM, VERSUCHE 1 BIS 3 SOMMER 2001; N = ANZAHL DER DARMPROBEN PRO STICHPROBE 5, 10 ODER 20; S = SOMMER; ○ = AUSREIßER .....	106
ABBILDUNG 12: AEROBE GESAMTKEIMZAHL IM DARM UND IM BAUCHLAPPEN VON GEFÜTTERTEN UND GENÜCHTERTEN RUNDEN FORELLEN, 2001 SOMMERVERSUCHE 1 UND 2, ANTEIL POSITIVER BAUCHLAPPENPROBEN IN PROZENT; S = SOMMER, BL = BAUCHLAPPEN, $N_{1(VERSUCH\ 1)} = 5$ , $N_{2(VERSUCH\ 2)} = 10$ .....	108

ABBILDUNG 13: VERGLEICH DES <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> -WACHSTUMS AUF DER HAUT, IN DER BAUCHLAPPEN- UND RÜCKENMUSKULATUR UND IM DARM VON RUNDEN UND LEEREN WINTER- UND SOMMERFORELLEN. S = SOMMER; W = WINTER; BM = BAUCHLAPPENMUSKULATUR; RM = RÜCKENMUSKULATUR .....	111
ABBILDUNG 14: FRISCHEGRAD-VERLAUF (GESAMTBEWERTUNG) BEI LEEREN UND RUNDEN ZANDERN DER GRUPPEN 4 (N=3) UND 5 (N=5) .....	115
ABBILDUNG 15: VERGLEICH VON FRISCHEGRAD (FG) - UND KOCHPROBEN (KP) - ERGEBNISSEN BEI ZANDERN DER GRUPPE 5; GESAMTBEWERTUNG; LEER = AUSGENOMMEN, RUND = UNAUSGENOMMEN; TAG 0: THEORETISCHER HÖCHSTWERT .....	116
ABBILDUNG 16: SENSORISCHE VERÄNDERUNGEN GEKOCHTER ZANDER- FILETS, GRUPPEN 4 UND 5; BEURTEILUNG VON AUSSEHEN .....	117
ABBILDUNG 17: SENSORISCHE VERÄNDERUNGEN GEKOCHTER ZANDER- FILETS, GRUPPEN 4 UND 5; BEURTEILUNG VON GERUCH .....	117
ABBILDUNG 18: SENSORISCHE VERÄNDERUNGEN GEKOCHTER ZANDER- FILETS, GRUPPEN 4 UND 5; BEURTEILUNG VON GESCHMACK .....	118
ABBILDUNG 19: SENSORISCHE VERÄNDERUNGEN GEKOCHTER ZANDER- FILETS, GRUPPEN 4 UND 5; BEURTEILUNG VON MUNDGEFÜHL .....	118
ABBILDUNG 20: AEROBE GESAMTKEIMZAHLEN (GKZ) AUF DER HAUT, IM DARM UND IM RÜCKENMUSKEL (RM) VON RUNDEN UND LEEREN ZANDERN, MITTELWERTE UND STANDARDABWEICHUNG, N = 5 .....	119
ABBILDUNG 21: NEMATODENANZAHL IN DEN EINGEWEIDEN DER EINZELNEN ZANDER-GRUPPEN .....	127
ABBILDUNG 22: BESTIMMUNG DES GEHALTES AN TVB-N IN DER FILETMUSKULATUR VON RUNDEN UND LEEREN ZANDERN .....	129
ABBILDUNG 23: VERGLEICH DER FRISCHEGRADENTWICKLUNG (FG) UND GESAMTKEIMZAHL (GKZ) BEI REGENBOGENFORELLEN, VERSUCHE 1 BIS 4 IM WINTER (W) 1999. BEWERTUNG DES FRISCHEGRADES: 9 = KLASSE EXTRA; 4 = BC, GRENZE DER VERKEHRSFÄHIGKEIT; < 4 = KLASSE C VERDORBEN, LOG 7 KbE/G UND CM <sup>2</sup> = KRITISCHER WERT .....	131
ABBILDUNG 24: KORRELATION ZWISCHEN FRISCHEGRAD UND GESAMTKEIMZAHL AUF DER HAUT VON AUSGENOMMENEN REGENBOGENFORELLEN, WINTER 1999 .....	132
ABBILDUNG 25: VERGLEICH DER FRISCHEGRADENTWICKLUNG (FG) UND DER GESAMTKEIMZAHL (GKZ) AUF DER HAUT UND IN DER MUSKULATUR VON ZANDERN, GRUPPE 4 UND 5 FÜR FG-BEWERTUNG, GRUPPE 3 FÜR MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG; BEWERTUNG DES FRISCHEGRADES: 9 = KLASSE EXTRA; 4 = BC, GRENZE DER VERKEHRSFÄHIGKEIT; < 4 = KLASSE C VERDORBEN .....	133

## TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: QUALITÄTSBESTIMMENDE KRITERIEN DES PRODUKTES FISCH (NACH WEDEKIND, 1995). ....	5
TABELLE 2: BEISPIELE FÜR QUALITÄTSMERKMALE VON FISCHPRODUKTEN BEI DER SENSORISCHEN EVALUIERUNG, NACH: CODEX GUIDELINES FOR THE SENSORY EVALUATION OF FISH AND SHELLFISH IN LABORATORIES, CAC-GL 31-1999, ANNEX 1, TABLE 1 .....	8
TABELLE 3: EU-QUALITÄTSKLASSIFIZIERUNGSSCHEMA NACH DER EG-VERORDNUNG NR.2406/96 ÜBER GEMEINSAME VERMARKTUNGSNORMEN FÜR FISCHEREIERZEUGNISSE, (STAND: FEBRUAR 1997), ANHANG I, A. MAGERFISCHE .....	10

TABELLE 4: QUALITATIVE VERÄNDERUNG DER BAKTERIELLEN FLORA DES FISCHES NACH DEM FANG BEI DER LAGERUNG IN EIS (NACH TÜLSNER, 1994). .....	26
TABELLE 5: BAKTERIELLE VERDERBSKOMPONENTEN (NACH CHURCH, 1998) .....	28
TABELLE 6: PATHOGENE BAKTERIEN BEI MEERESTIEREN (MODIFIZIERT NACH HUSS, 1995) .....	31
TABELLE 7: BAKTERIEN ALS GESUNDHEITSRISIKEN BEIM VERZEHR VON FISCHEREIERZEUGNISSEN (NACH FELDHUSEN, 1999).....	32
TABELLE 8: EIGENSCHAFTEN DER FÜNF UNTERSUCHTEN ZANDERGRUPPEN .....	49
TABELLE 9: EIGENSCHAFTEN DER UNTERSUCHTEN REGENBOGENFORELLENGRUPPEN .....	50
TABELLE 10: VERWENDUNGSZWECK UND NÄHRMEDIENTEN ZUM MIKROORGANISMENNACHWEIS .....	53
TABELLE 11: VERWENDUNGSZWECK UND NÄHRMEDIENTEN FÜR BIOCHEMISCHE TESTS DER GATTUNGS- UND SPEZIESDIFFERENZIERUNG .....	54
TABELLE 12: MODIFIZIERTES SCHEMA FÜR DIE BESTIMMUNG DES FRISCHEGRADES VON REGENBOGENFORELLEN IN ANLEHNUNG AN DAS EU-QUALITÄTSKLASSIFIZIERUNGSSCHEMA NACH DER EG-VERORDNUNG NR.2406/96 ÜBER GEMEINSAME VERMARKTUNGSNORMEN FÜR FISCHEREIERZEUGNISSE. ....	60
TABELLE 13: BEWERTUNGSBOGEN FÜR DIE BESTIMMUNG DES FRISCHEGRADES VON FORELLEN, HERBST 2000. ....	62
TABELLE 14: SENSORISCHE UNTERSUCHUNGEN (FRISCHEGRADBESTIMMUNG UND KOCHPROBE) BEI REGENBOGENFORELLEN, WINTER 1999 UND HERBST 2000 .....	63
TABELLE 15: KOCHPROBENSCHHEMA FORELLEN HERBST 2000.....	64
TABELLE 16: BEWERTUNGSBOGEN FÜR DIE BESTIMMUNG DES FRISCHEGRADES VON ZANDER .....	67
TABELLE 17: BEWERTUNGSBOGEN FÜR DIE BESTIMMUNG DER FILETBESCHAFFENHEIT VON ZANDERN DURCH DIE KOCHPROBE .....	68
TABELLE 18: PROBENENTNAHMESCHHEMA DER UNTERSUCHUNGEN AN OSTSEE-ZANDER, GRUPPE 3 (JANUAR 2001), BU- BAKTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG (GKZ, SSO, PSEUDOMONADEN).....	69
TABELLE 19: BAKTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN REGENBOGENFORELLEN IM SOMMER 2001, PROBENAHME UND UNTERSUCHUNGEN IN 3 DURCHGÄNGEN .....	73
TABELLE 20: KEIMSPERKTRUM BEI DER UNTERSUCHUNG VON REGENBOGENFORELLE UND ZANDER .....	74
TABELLE 21: UNTERSUCHUNGSSPERKTRUM DER QUALITATIVEN UND QUANTITATIVEN KEIMERFASSUNG BEI REGENBOGENFORELLEN, DURCHGANG NR. 1 IM SOMMER 2001 .....	74
TABELLE 22: DIFFERENZIERUNGSSCHHEMA FÜR AEROMONAS SPP. (NACH BOCKEMÜHL 1992, MIKROBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK, S. 102; SCHUBERT ET AL., 1990; JANDA, 1991; JEPPESEN, 1995; SIESENOP UND BÖHM, 2000). ....	82
TABELLE 23: BIOLOGISCHE MERKMALE VON VIBRIONACEAE AUS KLINISCHEM MATERIAL (NACH BAUMANN ET AL. 1984, BOCKEMÜHL 1992, MIKROBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK, S. 102).....	83
TABELLE 24: FRISCHEGRAD-GESAMTBEWERTUNGEN (= PUNKTEBEWERTUNG) VON AUSGE-NOMMEN UND RUND GELAGERTER FORELLEN AUS DER KREISLAUFANLAGE DES VERSUCHSGUTES, HERBST 2000 ....	95
TABELLE 25: GESAMTBEWERTUNG (=PUNKTEBEWERTUNG) DER GEKOCHTEN FILETS, FORELLEN AUS DER KREISLAUFANLAGE DES VERSUCHSGUTES, HERBST 2000 .....	96

TABELLE 26: VERGLEICH DER GESAMTKEIMZAHLEN AUF DER HAUT VON FORELLEN, VERSUCH IM WINTER 1999 UND IM SOMMER 2001; MITTELWERTE UND STANDARDABWEICHUNGEN .....	100
TABELLE 27: SOMMERVERSUCH 1. DURCHGANG; GKZ IM BAUCLAPPEN RUNDER FISCHE, ANZAHL POSITIVER FISCHE KLEINER ALS NACHWEIS- BZW. QUANTIFIZIERUNGSGRENZE .....	104
TABELLE 28: ANZAHL ENTEROBACTERIACEAE-POSITIVER HAUT- UND MUSKELPROBEN VON FORELLEN, WINTER- UND SOMMERVERSUCHE, N=5.....	110
TABELLE 29: ANZAHL AEROMONAS-POSITIVER HAUT- UND MUSKELPROBEN UND ANZAHL AEROMONAS-POSITIVER FISCHE BEIM VERSUCHSDURCHGANG 1 DER WINTERFORELLEN, N = 5 .....	112
TABELLE 30: KEIMZAHLEN IN MUSKELPROBEN VON ZANDER (IN MPN/G UND IN LOG KBE/G), MPN = MOST PROBABLE NUMBER, GKZ = GESAMTKEIMZAHL, SSO = SPECIFIC SPOILAGE ORGANISM, PSEUDOM. = PSEUDOMONAS-KEIMZAHLEN.....	121
TABELLE 31: ZAHL DER DARM- UND RÜCKENMUSKELPROBEN MIT BAKTERIELLEM WACHSTUM IM HAUPTVERSUCH.....	122
TABELLE 32: ENTWICKLUNG DER AEROBEN GKZ (MITTELWERTE), DER SPEZIFISCHEN VERDERBSKEIME UND DER PSEUDOMONADEN AUF DER HAUT, IM DARM UND IN DER MUSKULATUR AUSGENOMMENER UND RUNDER ZANDER; VORVERSUCHE 1 (N = 45) UND 2 (N = 34) UND HAUPTVERSUCH (N = 55).....	123
TABELLE 33: ERGEBNISSE DER NEMATODEN-UNTERSUCHUNG .....	126
TABELLE 34: ZANDER-HAUPTVERSUCH: BESTIMMUNG DES TVB-N-GEHALTES (FLÜCHTIGER BASENSTICKSTOFF) IN DER MUSKULATUR LEERER UND RUNDER ZANDER.....	128
TABELLE 35: KORRELATION ZWISCHEN FRISCHEGRAD UND GESAMTKEIMZAHL IN DER MUSKULATUR UND AUF DER HAUT VON AUSGENOMMENEN (LEER) UND NICHT AUSGENOMMENEN (RUND) REGENBOGENFORELLEN.....	132

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

A.	<i>Aeromonas</i>
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BMG	Bundesministerium für Gesundheit
BMVEL	Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
bzw	beziehungsweise
C.	<i>Clostridium</i>
ca.	circa
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
E.	<i>Escherichia</i>
Fisch-HV	Fisch-Hygiene-Verordnung
GKZ	Gesamtkeimzahl, Gesamtkeimzahlen
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
ICMSF	International Commission on Microbiological Specification for Foods
IMP	Inosinmonophosphat
KbE	Kolonie bildende Einheiten
KOH	Kaliumhydroxid
L.	<i>Listeria</i>
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfgegenständegesetz
log	dekadischer Logarithmus
MDT	Magen-Darm-Trakt
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration wässriger Lösungen
Ps.	<i>Pseudomonas</i>
PW	Prüfwert für den t-Test nach Student $PW = \frac{MW1 - MW2}{SD} * \sqrt{\frac{N1 * N2}{N1 + N2}}$
r <sub>s</sub>	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 1 - \frac{6 * \sum (Xi - Yi)^2}{n(n^2 - 1)}$
S.	<i>Salmonella</i>
sd	Standardabweichung $sd = \sqrt{\frac{\sum (Xi - X)^2}{N - 1}}$

*SD* ist ein aus beiden Stichproben ermittelter gemeinsamer Schätzwert für den unbekannten Wert der Varianz der Grundgesamtheit

$$SD = \sqrt{\frac{(N1 - 1) * sd1^2 + (N2 - 1) * sd2^2}{N1 + N2 - 2}}$$

*Sh.* *Shewanella*

sp., spp. Spezies (Singular und Plural)

SSP Specific Spoilage Organisms

Tab. Tabelle

TMA Trimethylamin

TMAO Trimethylaminoxid

TVB-N Total volatile basic nitrogen

*V.* *Vibrio*

$\nu$  Freiheitsgrade  $\nu = N1 + N2 - 2$

$\bar{x}$  arithmetisches Mittel  $\bar{x} = \frac{1}{N} * \sum Xi$

z.B. zum Beispiel

z.T. zum Teil



# 1 Einleitung

Als ernährungsphysiologisch hochwertige Lebensmittel werden Fisch und Meeresfrüchte beim Verbraucher immer beliebter und zunehmend als gute Wahl empfunden, wie der steigende Verbrauch in den vergangenen Jahren zeigt. Im Jahre 2000 betrug der Nahrungsverbrauch an Fisch und Fischwaren in Deutschland 1.088.000 Tonnen. Pro Kopf der Bevölkerung sind das schätzungsweise 13,3 kg im Jahr, davon knapp 2 kg Süßwasserfische. Ca. 14 % des Pro-Kopf-Verbrauchs entfallen dabei auf Frischfisch (Fiz, 2001).

Die Nachfrage und die Akzeptanz von Fisch beim Verbraucher hängen in erster Linie von der qualitativen Beschaffenheit ab. Diese überprüft die amtliche Lebensmittelkontrolle. Dabei werden neben der Einteilung der Ware in Frische- bzw. Handelsklassen und der Ermittlung gustatorischer Eigenschaften von eingelagertem Fisch objektive Verfahren zur Qualitätsbestimmung, wie mikrobiologische, biochemische, chemische und physikalische Untersuchungen, durchgeführt.

Mit Qualität verbindet der Kunde gesunde und schmackhafte Eigenschaften des Lebensmittels. Eine wichtige Rolle für eine Kaufentscheidung spielt die sichtbare äußerliche Beschaffenheit von Fisch, wie z.B. der Status ausgenommen oder rund, d.h. unausgenommen. Verbraucher in Deutschland ziehen in der Regel ausgenommene Fische vor, da schon die Eingeweide im Bauchraum runder Fische die Ware häufig unappetitlich wirken lassen. Im Gegensatz dazu meinen Verbraucher in südeuropäischen Ländern, an den Eingeweiden des Fisches die Frische der Ware besser ablesen zu können, so dass ausgenommene Fische als nicht mehr frisch gelten und runde Fische bevorzugt werden.

Gesetzlich festgelegt wurde das Ausnehmen von Speisefischen zunächst in der Richtlinie 91/493/EWG, die 1994 durch Verabschiedung der Fisch-Hygiene-Verordnung (Fisch-HV) in nationales Recht übergang. Nach § 4 Absatz 1 sind nach der derzeit gültigen Fassung fast alle Süßwasser- und Seefische unverzüglich nach dem Fang auszunehmen.

In erster Linie wurde diese Hygieneanforderung im Hinblick auf den Nematodenskandal von 1987 getroffen. Nach wie vor existieren aber über die Migration der *Anisakis*-Larven aus den Eingeweiden in das Fischfleisch während der Lagerung in Eis widersprüchliche Erkenntnisse, so dass der Sachverhalt nicht

hinreichend geklärt erscheint. Weitere hygienische Risiken, wie eine erhöhte Belastung mit potentiell humanpathogenen Bakterien bei unausgenommen gelagerten Fischen, sind bislang nur unzureichend untersucht worden. Vergleiche verfahrenstechnischer und qualitativer Unterschiede ausgenommener und runder Seefische sind zahlreich unternommen worden, hingegen sind ähnliche Studien bei Süßwasserfischen zur Beurteilung hygienisch-gesundheitlicher Parameter selten, bzw. festgelegte Qualitätskriterien etwa in Form von Handelsklassen bislang noch nicht existent. Aus diesem Grund erschien es notwendig, einen Kriterienkatalog der Beschaffenheit von Frischfisch zu erstellen, der an die Verderbsprozesse von Süßwasserfischen während der Lagerung angepasst ist.

Ein vom Bundesministerium für Gesundheit bzw. Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft finanziertes Forschungsvorhaben des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) sollte wissenschaftlich klären, ob das strikte Gebot des Ausnehmens in der deutschen Fisch-HV dem weniger strengen europäischen Gemeinschaftsrecht angepasst werden könnte. Forschergruppen aus drei Instituten (Bundesforschungsanstalt für Fischerei Hamburg, Veterinärinstitut für Fische und Fischwaren Cuxhaven und BgVV Berlin) führten zur Klärung dieser Fragen sensorische, mikrobiologische, chemische und parasitologische Untersuchungen an See- und Süßwasserfischen durch.

Für diese Promotionsarbeit wurden vergleichende Untersuchungen von ausgenommenen und nicht ausgenommenen Süßwasserfischen unter kontrollierten Lagerungsbedingungen durchgeführt. Hierfür wurden Regenbogenforellen und Zander als Modellfischart gewählt. Ziel war es, durch die Beurteilung des Keimstatus (Verderbskeime und potentiell humanpathogene Bakterien) und der sensorischen Eigenschaften von ausgenommenen und nicht ausgenommenen Fischen gesundheitlich-hygienische Gründe für bzw. gegen das Ausnehmen zusammenzutragen und zu bewerten. Hierfür wurden fischartspezifisch ein Frischegradkriterienkatalog und ein Kochprobenschema speziell für die Erfassung sensorischer Eigenschaften von Süßwasserfischen entwickelt.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Übersicht: Der Verderb von Frischfisch

Neben verarbeiteten Fischprodukten, die durch Räuchern, Marinieren oder Salzen zur Verlängerung der Haltbarkeit konserviert werden, gelangt Fisch in der Bundesrepublik zu einem großen Anteil als Frischfisch auf den Markt und in die Haushalte der Verbraucher. Gemäß der Fischhygiene-Verordnung versteht man unter Frischfisch unbehandelt gebliebene Ware, die je nach Anforderung gereinigt, ausgenommen, zerteilt und gekühlt gelagert wird.

Der Kunde wünscht einwandfreien, bestimmten Frischekriterien entsprechenden frischen Fisch, der ihn durch sein äußeres Erscheinungsbild zum Kauf animiert und in keinem Fall Ekel bei ihm hervorruft. Die Verkaufsfähigkeit sowie die Akzeptanz und Beurteilung des Produktes durch den Verbraucher ist in großem Maße abhängig von der Lagerungsfähigkeit. Diese wird bestimmt durch die Art und die Geschwindigkeit des Verderbs, der wiederum von verschiedenen Faktoren ausgelöst wird.

Verantwortlich für den Verderb sind bakterielle, autolytische und oxidative Veränderungen und Prozesse während der Lagerung von Fisch und Fleisch. Sie sind zurückzuführen auf spezifische intrinsische und extrinsische Faktoren, wie die Temperatur, die Wasserbindungsfähigkeit, den pH-Wert der Muskulatur post mortem, das Redoxpotential (Eh) und mikrobiologische Interaktionen oder den Status des Fisches -ausgenommen oder nicht ausgenommen- (BAYLISS, 1996; GRAM und HUSS, 1996). Verderb führt zu Veränderungen von Textur und Aroma, zur Minderung des Genusswertes und schließlich zur Genussuntauglichkeit.

Aufgrund ihres hohen Eiweiß- und Wassergehaltes, ihres Gehaltes an freien Aminosäuren und anderen löslichen freien stickstoffhaltigen Verbindungen sind Fischmuskelproteine leicht abbaubar, so dass Fische zu den leicht verderblichen Lebensmitteln gezählt werden (KARNOP, 1982; KIM, 1984; FRASER und SUMAR, 1998a).

Faktoren, die während der Lagerung des frischen Fisches auf Eis zum Verderb des Fischereierzeugnisses und somit zu einer Qualitätsminderung bis hin zur Verkehrs- und Verzehrsumfähigkeit des Produktes führen können, werden in den Kapiteln 2.3.1

bis 2.3.3 detailliert dargestellt. Dabei soll in erster Linie der Einfluss der Bakterienflora auf die Verderbsprozesse und auf die verschiedenen Frischekomponenten des Fisches erläutert werden

Zunächst werden in den folgenden Kapiteln die Auswirkungen des Fischverderbs und die praktische Vorgehensweise bei der Frischebestimmung durch übliche sensorische Verfahren beschrieben.

## **2.2 Die Bestimmung des Frischegrades und des sensorischen Verderbsverlaufs**

### **2.2.1 Der Begriff der Produktqualität bei Fisch**

Fische sind leicht verderbliche Lebensmittel. Der Fischmuskel ist anfälliger für den Verderb als der Säugetiermuskel. Ein niedrigerer Gehalt an Konnektivfasern und der höhere Gehalt an freien Aminosäuren führt zu einer geringeren Stabilität als bei anderen Muskelarten, so dass die Lagerfähigkeit zeitlich eng begrenzt ist (PEDROSA-MENABRITO und REGENSTEIN, 1988). Die für den Kunden erkennbare und garantierte Frische des Produktes Fisch ist daher ausschlaggebend für die Nachfrage und somit für den Absatz der Ware.

Die Qualität tierischer Lebensmittel wird unter anderem bestimmt vom ernährungsphysiologischen Wert, vom hygienischen Status und von den Inhaltsstoffen des Produktes. Trennt man die Merkmale der Produktqualität bei Fischen nach inneren und äußeren Kriterien, so werden zu den äußeren Kriterien die Stückmasse, die Sortierung sowie das äußere Erscheinungsbild der Fische wie Aussehen und Unversehrtheit an Haut und Flossen gezählt (WEDEKIND, 1999). Die chemische Filetzusammensetzung, die physikalische Fleischbeschaffenheit und die sensorische und technologische Fleischqualität bestimmen die innere Qualität. Sie haben einen unmittelbaren Einfluss auf die Haltbarkeit und Verarbeitungseignung des Fischfleisches. Tabelle 1 zeigt die qualitätsbestimmenden Kriterien des Produktes Fisch.

Tabelle 1: Qualitätsbestimmende Kriterien des Produktes Fisch (nach WEDEKIND, 1995).

<b>Äußere Qualität</b>		<b>Innere Qualität</b>	
<b>Aussehen</b>	<b>Körperzusammensetzung</b>	<b>Fleischbeschaffenheit</b>	<b>Fleischqualität</b>
		<i>chemisch</i>	<i>technologisch</i>
Stückmasse	Korpulenz	Wassergehalt	Räucherverlust
Sortierung	Kopfanteil	Eiweißgehalt	Garverlust
Unversehrtheit	Ausschlachtung	Fettgehalt	Gefrierverlust
Frische	Innereienanteil		Kühlungsverlust
Körperfarbe	Schlachtverlust		Farbhaltung
Filetanteil		<i>physikalisch</i>	<i>sensorisch</i>
		pH-Wert	Geruch
		Festigkeit (roh)	Geschmack
		Wasserbindung	Farbe (visuell)
		Farbe, Helligkeit (instrumentell gemessen)	Konsistenz (verarbeitet)

Qualitätsmerkmale werden beeinflusst von umwelt- und tierbedingten Faktoren. Zu den umweltbedingten Einflüssen zählt man die Fütterung (Zusammensetzung der Nahrung hat Einfluss auf den Protein- und Fettgehalt im Muskel), die Haltung (Wassertemperatur, Haltungsdichte), die Nüchterung und Belastung vor der Schlachtung, die Schlachtmethode und die spätere Verarbeitung und Lagerung. Diese Faktoren sind vom Menschen bei Aquakulturfischen lenkbar. Tierbedingte Einflussfaktoren, wie genetische Veranlagung, Alter, Geschlecht, Geschlechtszeitpunkt und Stressanfälligkeit, können von Spezies zu Spezies variieren (WEDEKIND, 1995). Die Textur, die Farbe, der Fettgehalt und somit das Aroma und die Beschaffenheit des Filets werden von diesen Faktoren mitbestimmt. Zur Feststellung der Fischqualität ist für den Handel und die verarbeitende Industrie die Frische der Ware der wichtigste Qualitätsparameter. Bei OEHLENSCHLÄGER (1999) findet sich folgende Definition von Frische: "Frische bedeutet bei Fisch, dass er in allen Eigenschaften nicht weit von denen entfernt ist, die er in eben dem Augenblick besaß, als er gefischt oder getötet wurde, oder dass erst eine kurze Zeitspanne vergangen ist, seit er gefangen oder geerntet wurde (...) Während Frische für eine gute Qualität essentiell ist, ist sie *a priori* noch keine Garantie für gute

Lebensmittelqualität." Solange der Fisch noch eine Vielzahl positiver Eigenschaften in optimaler Ausprägung aufweist, die er auch nach dem Fang besaß, gilt er als frisch.

Um dem Verbraucher eine gleichbleibend gute Qualität bieten zu können, unterliegt Frischfisch speziellen Verfahren zur Einschätzung und Bewertung des Frischegrades und der Qualität. Dazu wird unterschieden zwischen subjektiven sensorischen (organoleptischen) und objektiven, instrumentalisierten Untersuchungsmethoden. Dabei erfolgt die Beurteilung der Tauglichkeit in erster Linie anhand der Ergebnisse der sensorischen Parameter (TÜLSNER, 1994). Die objektiven Methoden hingegen zeigen nur einige Ausschnitte der postmortal ablaufenden Veränderungen auf der Basis von chemischen, physikalischen und mikrobiologischen Vorgängen. Derartige Befunde sollen das Ergebnis der sensorischen Untersuchung festigen. Laut PRIEBE (1984) ist es nicht ausreichend, nur Laborwerte als Entscheidungsmaßstab heranzuziehen. Seiner Meinung nach kann ein Laborwert nur als unterstützender Befund bei der Erhebung des Sensorikbefundes dienen und nur dieser der Maßstab sein. Eine Eichung solcher Methoden gegen subjektive sensorische Bestimmungen bei der Entwicklung von Methoden zur Frischegraderfassung ist aus diesem Grunde notwendig.

### **2.2.2 Der Begriff der Sensorik**

Zur sensorischen Bewertung von Lebensmitteln werden Beurteilungsschemata entwickelt, in denen alle wesentlichen charakteristischen Veränderungen beim Verderb erfasst und beschrieben und in der zeitlichen Abfolge ihres Auftretens geordnet sind. Prüfbedingungen müssen im Voraus exakt festgelegt werden. In § 35 LMBG L-00.90-1 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren sind die allgemeinen Grundlagen der sensorischen Prüfungen beschrieben. Sensorik wird wie folgt definiert: "Sensorik ist die Wissenschaft vom Einsatz menschlicher Sinnesorgane zu Prüf- und Messzwecken. Die dabei benutzte Methodik wird als Sensorische Analyse bezeichnet. Sie umfasst die Planung, Durchführung und Auswertung von sensorischen Prüfungen sowie gegebenenfalls die Interpretation der Ergebnisse." Sensorische Methoden müssen unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen wissenschaftlich durchgeführt werden. Dabei ist es wichtig, die Effekte

von Testumgebung oder subjektiver Neigungen der Prüfpersonen zu reduzieren. Durch eine "Beschreibende Prüfung" soll eine möglichst genaue wertneutrale verbale oder graphische Aufgliederung (Beschreibung) der Merkmale und Merkmalseigenschaften von Proben erreicht werden.

Der Mensch nutzt Sinneswahrnehmungen zur Aufnahme und Verarbeitung sensorischer Merkmale eines Lebensmittels. Durch Sehen, Riechen, Schmecken, Tasten und Hören können Charakteristika von Lebensmitteln empfunden und Sinneseindrücke festgehalten werden. Bei der sensorischen Begutachtung von Lebensmitteln mittels Sinneseindrücken werden Merkmale des Lebensmittels wie Farbe, Form, Geruch, Geschmack, Struktur und Klang untersucht und beschrieben. Prüfpersonen sollten viel Erfahrung und Übung in der Prüfung des jeweiligen Lebensmittels mitbringen, um Ergebnisse mit einer hohen Aussagekraft über die Qualität der untersuchten Ware zu erhalten. Die Resultate von Sinnesprüfungen hängen stark von der Qualifikation der Prüfpersonen ab und können von Person zu Person sehr unterschiedlich sein (OSTRANDER und MARTINSEN 1976).

Laut OEHLENSCHLÄGER (1999) ist die sensorische Bewertung heute die wichtigste Methode für die Frischebestimmung im gesamten Fischsektor. Dabei werden sensorische Bewertungsmethoden standardisiert, um durch die Verbesserung der Methoden und durch eine bessere Ausbildung der Prüfpersonen die sensorische Bewertung zu einer objektiven Meßmethode zu machen.

#### 2.2.2.1 Methoden der sensorischen Analyse bei Fischen

##### Frischegradbestimmung

Seefischware wird nach der Anlandung auf seine Verkehrseignung überprüft und in Größe- und Frischeklassen eingeteilt. Die Anforderungen an die sensorische Beschaffenheit von Fischen, nach denen die Einteilung erfolgt, sind in der Verordnung (EWG) Nr. 2406/96 des Rates über gemeinsame Vermarktungsnormen für Fischereierzeugnisse und in den Leitsätzen für Fisch und Fischerzeugnisse festgelegt. Der Frischegrad von Seefischen wird laut Vermarktungsnorm für gekühlte Fischereierzeugnisse durch eine sensorische Prüfung beurteilt, die sich auf bestimmte Lokalisationen am Fisch bezieht. Dazu gehören die visuell feststellbare Beschaffenheit der Haut, der Augen, der Kiemen und der Muskulatur. Den einzelnen Merkmalen werden bestimmte Kriterien zugeordnet.

Zur Feststellung der Frische bei Fischen werden in den Codex Alimentarius-Richtlinien für die sensorische Bewertung von Fischen und Schellfisch (1999) die in Tabelle 2 aufgeführten Kriterien und Merkmalsabstufungen vorgeschlagen.

Tabelle 2: Beispiele für Qualitätsmerkmale von Fischprodukten bei der sensorischen Evaluierung, nach: Codex Guidelines for the Sensory Evaluation of Fish and Shellfish in Laboratories, CAC-GL 31-1999, Annex 1, Table 1

Probenart	Merkmal	Kriterien und Beschreibung
roher Ganzfisch ausgenommen oder unausgenommen	Oberfläche	Farbe: hell, trübe/stumpf, ausgebleichen Schleim: farblos, verfärbt
	Haut	Verletzung: keine, punktuell, flächige Abschürfungen
	Augen	Form: konvex, flach, konkav Helligkeit: klar, trübe <b>FARBE: NORMAL, VERFÄRBT</b>
	Bauchhöhle	Eingeweide: intakt, verdaut Sauberkeit (bei runden Fischen): vollständig ausgenommen und gereinigt, unvollständig ausgenommen, nicht gewaschen Bauchlappen: hell, sauber, verfärbt, verdaut Parasiten: nicht vorhanden, vorhanden Blut: hell, rot, braun
	Textur	Haut: glatt, rauh/sandig Fleisch: fest, weich
	Kiemen	Farbe: hellrot oder rosa, verfärbt Schleim: klar, opak, verfärbt
	Kiemen-Geruch	frisch, charakteristisch, neutral, leicht sauer, leicht fade, verdorben, verfault
rohes Filet	Erscheinung	durchsichtig, glatt, glänzend, natürliche Farbe, opak, stumpf, blutgefärbt, verfärbt
	Textur	fest, elastisch, weich, wie Plastik
	Geruch	Seefisch, frisch, neutral, sauer, fade, verdorben, verfault
gekochtes Filet	Geruch	Verderb: Seefisch, frisch, neutral, modrig, sauer, verdorben Abweichungen: abwesend, Desinfektionsmittel, Heizöl, Chemikalien, Sulphide
	Geschmack	Verderb: süß, cremig, frisches Öl, neutral, sauer, oxidiert, faulig, modrig, fermentiert, ranzig, bitter Abweichungen: abwesend, Desinfektionsmittel, Heizöl, sehr bitter, alkalisch, nach Polyphosphaten, Chemikalien
	Textur	saftig, fest, weich, klebrig, gelatineartig, trocken

Der Verlauf der postmortalen Veränderungen bei Fischen ist innerhalb von 1 bis 2 Wochen bis zum Verderb der Ware gut beobachtbar. Die Farbe der Haut verändert sich und verliert zusehend an Intensität, da keine Farbpigmente mehr gebildet und transportiert werden. Während der Lagerung kann es in den Lagerbehältern zu



gegenseitiger Reibung zwischen den Fischkörpern kommen, die zu einem Verlust der Schuppen und zu oberflächlichen Schäden führt ("abgefischte" Ware).

Der von den Schleimdrüsen postmortal ausgesonderte Schleim wird nach TÜLSNER (1994) auf eine Reaktion der Schleimdrüsen zurückgeführt. Die Bakterien auf der Haut verändern im Laufe der Lagerung die Konsistenz der Schleimschicht von glasklar und fadenziehend über zunehmend trüb bis zu milchig-gelb und flockig. Die ursprünglich blutrote Farbe der Kiemenbögen wird durch Oxidation des Hämoglobin blass und später braun und gelblich. Bakterien sorgen auch hier für eine starke Schleimbildung. Die Kiemenblätter werden im Laufe der Lagerung an den Rändern unregelmäßig und ausgefranst. Die anfänglich prallen, nach außen gewölbten Augen sinken konkav ein und trocknen aus, die Augenflüssigkeit und die Linsen trüben sich. Die Veränderungen in der Textur der Muskulatur können durch Fingerdruck festgestellt und gemessen werden. Nach der Auflösung der Totenstarre lösen sich die festen Strukturen des Muskels allmählich auf, er verliert an Elastizität und wird weicher (TÜLSNER, 1994).

Im EU-Qualifikationsschema erhalten die Kriterien der einzelnen Merkmale anhand einer Klassifizierungstabelle eine Zuordnung zu einer bestimmten Klasse. "E" (extra) steht für hervorragende Qualität, "A" für sehr gute bis gute und "B" für gute bis noch zufriedenstellende Qualität (Tabelle 3). Weiterhin ist in der Frischegradbestimmung die "Grenze der Verkehrsfähigkeit" festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt ist der Fisch noch nicht unbedingt verdorben, aber hat keine Lagerungsreserven mehr und ist nicht mehr handelbar. Im Vergleich dazu gilt bei der Kochprobe als entscheidendes Kriterium die "Grenze der Verzehrsmöglichkeit", wenn der Fisch als verdorben angesehen wird und nicht mehr zum menschlichen Verzehr geeignet ist.

Tabelle 3: EU-Qualitätsklassifizierungsschema nach der EG-Verordnung Nr.2406/96 über gemeinsame Vermarktungsnormen für Fischereierzeugnisse, (Stand: Februar 1997), Anhang I, A. Magerfische.

<b>Friskheklassen</b>				
	<b>Extra</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>Nicht zugelassen<sup>(1)</sup></b>
<b>Haut</b>	Kräftege, glänzende Farbe oder schillernde Farbe; ohne Verfärbung	Kräftege Farbe aber ohne Glanz	Verblassende und stumpf werdende Farbe	Stumpfe Farbe <sup>(2)</sup>
<b>Schleimmantel</b>	Wasserklar	Etwas wolkig	Milchig	Gelblich-grauer trüber Schleim
<b>Augen</b>	Hervortretend (prall); schwarze glänzende Pupille, durchsichtige Hornhaut	Hervortretend aber nicht mehr prall; schwarze stumpfe Pupillen; leicht schillernde Hornhaut	Flach, schillernde Hornhaut, getrühte Pupille	In der Mitte eingesunken; graue Pupille, milchige Hornhaut <sup>(2)</sup>
<b>Kiemen</b>	Kräftege Farbe ohne Schleim	Nachlassende Farbe; durchsichtiger Schleim	Braun / grau, blasser werdend; trüber zähflüssiger Schleim	Gelblich; milchiger Schleim <sup>(2)</sup>
<b>Peritoneum (bei leeren Fischen)</b>	Glatt; glänzend; schwer von Muskelfleisch abzulösen	Etwas stumpf; kann vom Muskelfleisch abgelöst werden	Uneben; leicht vom Muskelfleisch abzulösen	Löst sich von selbst ab <sup>(2)</sup>
<b>Geruch von Kiemen und Leibeshöhle</b>	Nach Seetang	Kein Geruch nach Seetang; neutraler Geruch	Fermentiert; leicht säuerlich	<sup>(2)</sup> Säuerlich
<b>Magerfische außer -Scholle oder Heilbutt</b>	Nach frischem Öl; Pfeffer- und Erdgeruch	Nach Öl; nach Seetang oder leicht süßlich	Nach Öl; ranzig, fermentiert, verschimmelt	Säuerlich
<b>Muskelfleisch</b>	Fest und geschmeidig; glatte Oberfläche <sup>(3)</sup>	Weniger geschmeidig	Etwas weich (schlaff), trüber Schleim; wächserne (samtene) und stumpfe Oberfläche	Weich, (schlaff) <sup>(2)</sup> ; Schuppen lösen sich leicht vom Muskel ab, runzlige Oberfläche

<sup>(1)</sup> Diese Spalte gilt nur bis zum Erlass eines Beschlusses der Kommission über Kriterien für zum menschlichen Verzehr ungeeigneten Fisch gemäß der Richtlinie 91/493/EWG,

<sup>(2)</sup> Oder noch stärker verdorben,

<sup>(3)</sup> Vor Eintritt der Totenstarre ist frischer Fisch nicht fest und geschmeidig, er wird aber dennoch in die Friskheklasse Extra eingestuft

In der Richtlinie des Rates vom 22. Juli 1991 zur Festlegung von Hygienevorschriften und der Vermarktung von Fischereierzeugnissen (91/493/EWG) wird festgelegt:

Anhang, Kapitel V: Gesundheitskontrollen und Produktionsüberwachung, Punkt II. Besondere Kontrollen: "1. Organoleptische Prüfungen: ... muss jede Partie Fischereierzeugnisse bei der Anlandung bzw. vor dem ersten Verkauf zur Beschau bereitgestellt und von der zuständigen Behörde auf Genusstauglichkeit geprüft werden. Diese Kontrolle besteht aus einer organoleptischen Einschätzung aufgrund von Stichproben". Falls die organoleptische Einschätzung ergibt, dass die Fischereierzeugnisse nicht zum Verzehr geeignet sind, sollen Maßnahmen ergriffen werden, um sie aus dem Markt zu nehmen. Weiterhin besagt die Verordnung, dass chemische und mikrobiologische Kontrollen durchgeführt werden können, wenn die organoleptische Einschätzung den geringsten Zweifel an der Frische von Fischereierzeugnissen aufkommen lässt.

### Kochprobe

Neben der Frischegradbestimmung steht den Prüfern noch die Methode der Verkostung des gekochten, gebratenen oder gegarten Fischfilets zur Verfügung. Auch hier werden geeignete Beurteilungsschemata entwickelt, in denen alle wichtigen charakteristischen Veränderungen beim Verderb erfasst, beschrieben und in eine zeitliche Reihenfolge gebracht werden. Die wichtigsten Merkmale des Produktes, die untersucht werden, sind das Aussehen, der Geruch, der Geschmack und die Konsistenz nach dem Erhitzungsvorgang. Die Merkmale werden durch Eigenschaften (Süße oder Saftigkeit) und Ausprägung (stark, wenig) beschrieben. Es sollten dabei möglichst einfache Adjektive benutzt werden, die auf einem bereits bestehenden Schema basieren können.

### **2.2.3 Einfluss der Lagerungsdauer auf sensorische Veränderungen von Fischen**

Bei Frischeverlaufs- und Verkostungsversuchen an See- und Süßwasserfischen wurden immer wieder ähnliche Beobachtungen am ganzen Fischkörper mit fortschreitender Lagerungsdauer gemacht. Allgemein wird die Verschlechterung der Qualität von Frischfisch in den ersten Tagen der Lagerung sensorisch charakterisiert durch einen beginnenden Verlust an „frischem Fisch-Geschmack“. Nach einer Periode, in der Geruch und Geschmack des Fisches als neutral oder unspezifisch beschrieben werden, werden die ersten Fehlgerüche und -geschmäcker

wahrgenommen. Diese dominieren immer mehr und führen zur sensorischen Zurückweisung des Fisches. Die Zeit bis zum Verderb ist stark beeinflusst von der jeweiligen Fischart und der Lagerungstemperatur.

Erstmals stellte 1963 DEUFEL einen Beurteilungsschlüssel für die organoleptische Beurteilung von Süßwasserfischen auf. Auf einer Skala von 0 bis 5 bewertete er die verschiedenen Abstufungen der Qualitätsveränderung von rohem Fisch. Dabei stellte er fest, dass bei einem Fisch die unterschiedlichen Indikatoren nur selten alle parallel zueinander die 5 Stufen durchlaufen. Ein Fisch mit einem starken fischigen und muffigen Geruch kann aufgrund seiner anderen, besser bewerteten Kriterien trotzdem mit einer Durchschnittsbewertung von 3 noch als genusstauglich gelten, auch wenn die Grenze der Genusstauglichkeit zwischen 3 und 4 liegt.

In Brackwasser kultivierte Regenbogenforellen, die 11 Tage ohne Eis bei +4°C lagerten, behielten in einer Untersuchung von TESKEREDZIC und PFEIFER (1987) ihre charakteristischen Frischemerkmale bis zum fünften Tag. Ab dem siebten Tag sanken die Augen, die Kiemen wurden blass und das Fleisch bekam eine weiche Konsistenz. Der Geruch verschlechterte sich vor allem am Kopfende. Am neunten Tag waren die sensorischen Veränderungen so ausgeprägt, dass die Fische als verdorben anzusehen waren. Andere Autoren beschreiben ähnliche Schemata mit Benotungen bei Frischfisch (TÜLSNER, 1994; HUSS, 1995). In einer Untersuchung von RODRIGUEZ et al. (1999) behielten ausgenommene Regenbogenforellen bis zum sechsten Tag der Eis- und der Kühlschranklagerung akzeptable Frischemerkmale. Eine längere Lagerungsfähigkeit wurde in einer Untersuchung an gegarten Filetproben von ausgenommenen tropischen Buntbarschen aus einer Aquakultur ermittelt, bei der die Fische im Mittel nach 21 Tagen Eislagerung unter optimalen Bedingungen mit einer befriedigenden bis mittelmäßigen Qualität noch verzehrsfähig waren (MANTHEY und KARL, 1984). Sie waren deutlich länger haltbar als See- und einheimische Süßwasserfische.

Ein dominierender Einfluss der Lagerungszeit auf den Frischeverlust zeigte sich auch in einer vergleichenden Untersuchung von FAERGEMAND et al. (1995), bei der die Beschaffenheit der Filettextur von Regenbogenforellen unter verschiedenen umweltbedingten Einflüssen, wie z.B. Fett- und Proteingehalt der Nahrung oder Nüchternungszeitraum und Schlachtmethode, getestet wurde.

## **2.3 Mechanismen des Verderbs - postmortale fischeigene, mikrobiologische und chemische Verderbsprozesse**

Auslöser für die oben beschriebenen Qualitätsverschlechterungen bis hin zum sensorisch wahrnehmbaren Verfall des Frischfisches ist eine Kombination aus (i) den im Fisch postmortal verändert ablaufenden Stoffwechselprozessen, aus (ii) enzymatischen Autolysevorgängen durch fischeigene Enzyme und aus (iii) bakteriellen Abbauprozessen (ASHIE et al., 1996; FRASER und SUMAR, 1998b).

### **2.3.1 Postmortale Stoffwechselprozesse**

Postmortal ablaufende biochemische Prozesse haben einen starken Einfluss auf den Ablauf autolytischer und bakterieller Vorgänge. Sie sind abhängig vom Zustand des Fisches zum Zeitpunkt des Todes.

#### **2.3.1.1 Postmortaler pH-Wert und der Rigor mortis**

Der lebende Muskel gewinnt seine Energie durch die Reaktionskette des Glykogenabbaus. Dieser kann effektiv nur unter aeroben Bedingungen mit ausreichender Sauerstoffzufuhr ablaufen (TÜLSNER, 1994). Durch den aeroben Glykogenabbau wird Energie freigesetzt für die Spaltung energiereicher Phosphate wie Adenosintriphosphat (ATP). Diese Spaltung wiederum stellt Energie für die Muskelkontraktion zur Verfügung, ATP wird im Anschluss an die Kontraktion wieder resynthetisiert. Mit dem Tod des Organismus kommt es zu einem Ausfall der Blutzirkulation und der Unterbrechung der Atmung, so dass die Gewebszellen nicht mehr hinreichend mit Sauerstoff versorgt werden, alle Prozesse der Energiebereitstellung und des Stoffwechsels laufen irreversibel ihrem Endpunkt zu. Die aufgrund von Sauerstoffmangel anaerob ablaufende Glykolyse ist langsamer als die aerobe und stellt der ATP-Spaltung nicht genug Energie zur Verfügung, so dass ATP nach der Spaltung nicht mehr ausreichend resynthetisiert wird. Aus energiereichen phosphorylierten Nukleotiden werden energieärmere Produkte ( $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{AMP} \rightarrow \text{IMP} \rightarrow \text{Inosin} \rightarrow \text{Hypoxanthin}$ ). Der Abbau von ATP läuft parallel mit dem erkennbaren Frischeverlust und kann auch als Frischeindikator dienen (GILL, 1995; GRAM und HUSS, 1996). Sinkt der ATP-Spiegel im Fischmuskel von 7 bis

10  $\mu\text{mol/g}$  auf  $<1,0 \mu\text{mol/g}$ , so lösen sich die bei der Muskelkontraktion zusammengelagerten Actin- und Myosinfilamente nicht mehr voneinander und verbleiben in einem Actomyosinkomplex. Der Muskel wird starr, es kommt zum Rigor mortis. Dieser wird erst durch das Einsetzen der Autolyse wieder gelöst. Je nach Fischart und Betäubungs- bzw. Tötungsart setzt der Rigor ungefähr 2 bis 12 Stunden nach dem Tod ein und kann bei einer Kühllagerung bis zu 72 Stunden anhalten (SEBASTIO et al., 1996). Im Vergleich dazu löst sich der Rigor bei Rindfleisch unter Kühllagerung bei  $-1$  bis  $0^\circ\text{C}$  erst nach 2 bis 3 Wochen (AMBROGGI et al., 1996).

Durch den unvollständig ablaufenden anaeroben Glykogenabbau bildet sich Milchsäure. Zusammen mit Wasserstoffionen aus der ATP-Spaltung sorgt sie für ein saures Milieu im Muskel, welches zu einer Denaturierung von Muskelproteinen führen kann. In der Fischmuskulatur kommt es zu einem End-pH-Wert von 6,6 bis 6,8 (KIM 1984; PEDROSA-MENABRITO und REGENSTEIN, 1988). Bei Säugern liegt dieser Wert mit pH von 5,5 bis 5,7 deutlich niedriger (TÜLSNER, 1994; AMBROGGI et al., 1996). Erst wenn die Glykogenreserven vollständig verbraucht sind, vermindert sich die Bildung von Milchsäure.

Entscheidend für die Dauer des Rigor mortis und den Verlauf der Fleischsäuerung postmortal sind die Energiereserven im Muskel und die Muskelaktivität des Fisches vor dem Tod. Eine erhöhte Aktivität des Tieres vor dem Tod, z.B. durch grobe Handhabung und Fangstress, führt zum verstärkten Glykogenabbau. Dadurch können anaerobe Stoffwechselprozesse bereits vor dem Tode eintreten und zu einem verfrühten Einsetzen von Fleischsäuerung und Rigor mortis, dem sog. „Stressrigor“, führen (WEDEKIND, 1995; SCHLÜTER, 1997). Stress kann z.B. durch die Art der Tötung entstehen. So setzte bei einer Untersuchung von AZAM et al. (1990) die Starre bei Forellen, die mit dem für den Fisch mit dem meisten Stress verbundenen Verfahren der  $\text{CO}_2$ -Betäubung betäubt wurden, am schnellsten ein und überschritt ihren Höhepunkt gegenüber den elektrisch und durch Kopfschlag betäubten Forellen relativ schnell. Ebenso stellten LOWE et al. (1993) in einer Untersuchung an Goldbrassen (*Pagrus auratus*) fest, dass bei ungestressten Tieren der Rigor mortis und das Absinken des ATP-Gehaltes im Muskel viel später einsetzten als bei Fischen, die Fangstress ausgesetzt waren. Je schonender und stressärmer also die Betäubung erfolgt, desto besser ist die Produktqualität. Eine Verlängerung des Rigor wiederum könnte zu einer Verlängerung der Haltbarkeit

führen (AMBROGGI et al., 1996). Weitere negative Auswirkungen der Stressbelastung vor der Schlachtung für die Fleischbeschaffenheit sind strukturelle und physikalische Veränderungen wie die Auflösung der Filetstruktur („gaping“), Zerstörung einzelner Zellbestandteile, ein geringeres Wasserbindungsvermögen und weiches Filet (WEDEKIND, 1995).

Auf autolytischem Weg wird der Rigor durch körpereigene Enzyme aufgelöst. Freigewordene stickstoffhaltige basische Abbauprodukte führen zu einer Erhöhung des pH-Wertes und begünstigen damit den Ablauf von bakteriellen proteolytischen Abbauprozessen. Der pH-Wert hat im Fischmuskel post mortem einen charakteristischen Verlauf. In der Anfangsphase sinkt er durch die anaerobe Milchsäurebildung, gefolgt von einem Anstieg im Zuge der Bildung flüchtiger basischer Komponenten; nach ungefähr 21 Tagen wird ein stagnierender Wert von 7,2 erreicht. Einige Autoren halten ihn daher neben dem Verlauf des Rigor mortis geeignet für die Bewertung der Fleischqualität (KIM, 1984; SEBASTIO et al., 1996; WEDEKIND, 1999). Hingegen zeigte sich in einer Untersuchung von MEYER und OEHLENSCHLÄGER (1996) an eisgelagertem Wittling (*Merlangius merlanus*) keine gute Korrelation des pH-Wertes der Filetmuskulatur mit der Lagerzeit in Eis. Aufgrund der großen Schwankungsbreite der Einzelwerte lässt sich der pH-Wert somit nur begrenzt bzw. gar nicht für die Frischebestimmung heranziehen.

#### 2.3.1.2 Postmortaler Fett- und Proteinabbau

Der Abbau von Fetten im Fischgewebe durch Oxidation erfolgt sowohl auf enzymatischem als auch auf nicht-enzymatischem Weg (FRASER und SUMAR, 1998a). Oxidative Prozesse spielen v.a. bei fetten Fischen eine wichtige Rolle, da Fischfette einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren aufweisen. Die für die Hydrolyse von Lipiden zuständigen Enzyme sind Triacyllipase, Phospholipase A2 und Phospholipase B (AUDLEY et al., 1978). Sie sind in der Haut, im Blut, in der Lymphflüssigkeit und mikrosomal enthalten und bauen Fettmoleküle zu freien Fettsäuren, Glycero-Phosphocholinen und anderen Verbindungen ab. Auf dem nicht-enzymatischen Weg bilden einige der freigewordenen Fettsäuren durch Sauerstoff freie Radikale, welche mit weiteren Fettmolekülen reagieren und Hydroperoxide formen, die in einer Kettenreaktion (Autoxidation der Fettsäuren) eine Zerstörung der

Fettmoleküle auslösen können (KANNER und KINSELLA, 1983; BAYLISS, 1996). Die Hydroperoxidation von Fischlipiden führt zu der Entwicklung des ranzigen Geruches und Geschmacks von Fischfilets (JOSEPHSON et al., 1987). Vor allem bei ausgenommenen Fischen kann dieser Effekt eine Rolle spielen, da die Bauchlappenmuskulatur der offenen Bauchhöhle dem Sauerstoff ausgesetzt wird (HANSEN, 1963). Ein weiterer Effekt der Hydroperoxidation kann die Oxidation des Myoglobins in Metamyoglobin sein, was einen Farbwechsel der Fischmuskulatur von frischem weiß-rosa nach gräulich-braun zur Folge hat (CHOW et al., 1987). Bei Forellen und Lachsen können die im Fleisch enthaltenen Carotinoide als Antioxidantien (Radikalfänger) eine Schutzfunktion ausüben und die Peroxidbildung unterbinden (BJERKENG und JOHNSON, 1995). Carotinoid-Pigmente können jedoch auch wie die Fette oxidieren und rufen dann in Fischfleisch eine häufig beobachtete Gelbfärbung hervor (COLBY et al., 1993).

Post mortem erfolgt der Abbau von strukturbildenden Proteinen autolytisch durch körpereigene Proteasen, den Kathepsinen der Muskulatur und den Trypsinen des Verdauungsapparates. Im lebenden Organismus wirken diese endogenen Enzyme auf die Steuerung von Stoffwechselprozessen, sowie auf Erhaltung und Aufbau des Körpers. Nach dem Tode kommt es infolge der glykolytischen pH-Senkung zur unkontrollierten Freisetzung proteolytischer Muskelenzyme und zu ungesteuerten Abbauprozessen. Kathepsine kommen im Fischmuskel und in Leber und Milz in viel größeren Mengen und mit einer 10fach höheren Aktivität vor als in der Muskulatur von Warmblütern (TÜLSNER, 1994). Autolytische Prozesse laufen hier schneller ab, unter sterilen Bedingungen kann es rasch zur völligen Verflüssigung des Muskelgewebes kommen. Vor allem ist dies der Fall bei der Lagerung von nicht oder nur unvollständig ausgenommenen Fischen oder bei einer mit Gewebeverletzungen einhergehenden groben Handhabung der Ware, die zur Zerstörung von Membranen und Zellen und somit zu einer schnelleren Freisetzung und Verbreitung der Gewebeenzyme führen kann.

Die Eingeweide erfahren post mortem durch die Verdauungsenzyme Pepsin, Trypsin und Erepsin des Magen-Darm-Traktes je nach Fischart unterschiedlich schnell eine Auflösung und Verflüssigung, so dass der Darminhalt durch die aufgelöste Darmwand das Muskelfleisch kontaminieren und erweichen kann. Durch rechtzeitiges Ausschachten können diese Enzyme entfernt werden (BAYLISS, 1996).



Eine verstärkte autolytische Gewebeauflösung im Bauchraum post mortem wird in Zeiten erhöhter Nahrungsaufnahme bei einigen Fischarten (z.B. Hering, Makrelen, Lodde), die in der Regel als Vollfische in den Handel kommen, beobachtet. Es entstehen „bauchweiche“ oder „bauchoffene“ Heringe mit stark eingeschränkter Haltbarkeit und Verwertbarkeit. Diesem Vorgang („belly burst“) kann durch unmittelbares Ausnehmen der Fische nach dem Fang entgegengewirkt werden (GILDBERG und RAA, 1980; PEDROSA-MENABRITO und REGENSTEIN, 1988; TÜLSNER, 1994). Als Protein-Abbauprodukte entstehen Peptide und freie Aminosäuren, die den Mikroorganismen als Nährsubstrate dienen (FRASER und SUMAR, 1998a/b).

### **2.3.2 Postmortale Veränderungen der Bakterienflora und der bakterielle Verderb**

Autolytische Veränderungen in der Fischmuskulatur führen zum Verlust von charakteristischem Fischgeruch und -geschmack. Die Endstadien des Verderbs mit der Produktion unangenehmer Geruchsstoffe sind auf Mikroorganismen zurückzuführen. Hierbei ist das Verhältnis zwischen autolytischem und bakteriellem Verderb abhängig von der Anfangskeimbelastung und der Keimart, der Lagerungstemperatur und der Verpackungsart. Wenige Tage post mortem überlagern sich in der Regel die autolytischen und mikrobiellen Veränderungen. Letztere gewinnen das Übergewicht und führen schließlich zum Verderb.

Bei der bakteriologischen Untersuchung von Frischfisch wird bei der Bestimmung der Keime unterschieden in eine Primärflora, die auf und im lebenden gesunden Fisch zu finden ist, und in eine Sekundärflora, die sich nach dem Fang und der Schlachtung der Fische auf der Haut und in der Muskulatur des Fisches post mortem entwickelt. Diese wiederum teilt sich auf in Bakterien, die beim Verderb im Fischgewebe gefunden werden aber keine Verderbsprozesse auslösen („spoilage association“), und in Bakterien, die durch ihren Stoffwechsel und durch Abbau von Fischgewebe und Produktion von Fehlgerüchen und -geschmäckern (off-odours und off-flavours) für den Verderb verantwortlich sind („spoilage bacteria“), den spezifischen Verderbniserregern („specific spoilage organisms - SSO“) (LISTON, 1980; HOBBS und HODGKISS, 1982).

### 2.3.2.1 Die Primärflora auf Fischen verschiedener Gewässer

Die poikilotherme Natur des Fisches lässt ein weites Keimspektrum auf Haut, Kiemen und in den Eingeweiden zu. Die Organismen der Umgebungsflora des Wassers finden sich auch auf der Oberfläche und in den Eingeweiden des Fisches, und man geht im Allgemeinen davon aus, dass sich die bakterielle Belastung von Bodenschlamm, Wasser und des aufgenommenen Futters auf die Zusammensetzung der Fischflora auswirkt (TÜLSNER, 1994; SAUPE, 1996; NEDOLUHA et al., 1997). Die Fischflora ist abhängig von der Fischart und den ökologisch und klimatisch unterschiedlichen Fanggebieten. In wärmeren Gebieten besteht sie zu einem hohen Prozentsatz aus mesophilen Bakterien, in der gemäßigten und kälteren Zone der Erde dominieren Psychrophile und Psychrotrophe. HORSELY (1973) stellte bei der Migration von Atlantischem Lachs von Salz- in Süßwasser eine Änderung der Haut- und Kiemenflora als Folge der verschiedenen Wasserkeime aus unterschiedlich belastetem Umgebungswasser fest. Hingegen lassen Ergebnisse einer Untersuchung von GUTTMANN-BASS et al. (1986) den Schluß zu, dass es keinen direkten Zusammenhang von Umgebung und Fischflora gibt. Hier war die Keimbelastung von Fischen, die in hochgradig verschmutztem Abwasser gehalten wurden, nicht höher als die von Fischen aus dem Handel. Auch einige andere Autoren konnten der allgemein akzeptierten Meinung, die Fischflora sei durch die Umgebung bestimmt, mit ihren Ergebnissen widersprechen. GONZALEZ et al. (1999) kamen zu dem Ergebnis, dass wilde und gezüchtete Forellen trotz einer stark unterschiedlichen bakteriellen Belastung des Umgebungswassers vergleichbare Keimzahlen und -arten auf der Haut, in den Kiemen und im Verdauungstrakt aufwiesen. Ebenso zeigten auch ACUFF et al. (1984), dass die Keimbelastung des Umgebungswassers nicht immer die Belastung auf der Haut der Fische wiedergibt, diese war um ca. 2 Zehnerpotenzen niedriger als die Wasserkeimzahl.

In den gemäßigten und kälteren Salzwassergebieten mit einer Temperatur von weniger als 10°C setzt sich die Keimflora zu 95 % aus psychrophilen, gramnegativen, aerob wachsenden, beweglichen Stäbchenbakterien zusammen (ICMSF 1998; HUSS, 1995). Dazu zählen *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter* (*Moraxella*), *Shewanella* (früher *Alteromonas*), *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. (*Vibrio*, *Photobacterium*) und *Aeromonas* spp. Grampositive Organismen

wie *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* und coryneforme Bakterien kommen ebenfalls in geringeren Anteilen vor. In wärmeren Gewässern und in den tropischen Ozeanen wird ein höherer Prozentsatz an mesophilen grampositiven Keimen und an *Enterobacteriaceae* nachgewiesen; diese machen etwa 50-60 % der Gesamtflora aus (LISTON, 1980).

Auf der äußeren Haut werden pro Quadratzentimeter je nach Umweltbedingungen  $10^2$  bis  $10^4$  Kolonie bildende Einheiten (KbE) an Mikroorganismen gemessen, bei ungünstigen Verhältnissen bis  $10^8$  KbE (SKOVGAARD, 1979); dabei liegt die Zahl der für den Fischverderb wichtigen Proteolyten zwischen  $10^2$  und  $10^5$  KbE/cm<sup>2</sup>.

Im Gegensatz zu den Seefischen findet sich bei Süßwasserfischen ein höherer Anteil an mesophilen grampositiven Keimen, wie *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, Coryneforme (LEUPOLD, 1997). Dominant sind jedoch auch hier die Psychrophilen. Typische Gattungen sind *Aeromonas* spp. und *Pseudomonas* spp. Dabei ist die Jahreszeit, die Art und der Zustand des Gewässers, die Fangmethode und die Art und Lebensweise der untersuchten Fische ausschlaggebend für die unterschiedliche Zusammensetzung und Verteilung der Organismenflora (SAUPE, 1996). Keimzahlbestimmungen ergaben auf der Haut frisch gefangener Süßwasserfische Werte kleiner als  $10^4$  KbE/cm<sup>2</sup> (HUSSAIN, 1976, SAUPE, 1996). In Gebieten mit höheren Wassertemperaturen wurden Bakterienzahlen bis  $4,6 \cdot 10^7$  KbE/cm<sup>2</sup> ermittelt (ABO-ELNAGA, 1980). Dagegen wird das Fleisch lebender gesunder Fische im Allgemeinen als keimfrei betrachtet und gilt somit als steril (SHEWAN und MURRAY, 1979; SAUPE, 1996; TÜLSNER, 1994; LEUPOLD, 1997).

Die Vielfalt der Mikroorganismen im Gastrointestinaltrakt der Fische wird zum einen zurückgeführt auf die Umgebung, zum anderen auf Menge und Herkunft der vom Fisch verzehrten Nahrung (HUSS 1995; ICMFS 1998). Die intestinale Mikroflora von frischem Seefisch besteht zum größten Teil aus Aeromonaden und/oder *Vibrio*, während in Süßwasserfischen neben Aeromonaden auch Flavobakterien und Pseudomonaden vorherrschen können (SAKATA 1980; NEDOLUHA und WESTHOFF, 1995; SUGITA et al., 1995; FELDHUSEN, 2000). LARSEN et al. (1978) zählten im Darm von Kabeljau bis zu  $10^7$  KbE/g vibrioähnliche Organismen. *Vibrionaceae* besitzen die Fähigkeit zur Adhärenz an die Schleimhaut des Fischdarms. Bei Aquakulturfischen sollte auch dem Wasserkeim *Plesiomonas shigelloides* Beachtung geschenkt werden, der sich als signifikanter Bestandteil der intestinalen Mikroflora von

Felsenbarsch (*Morone saxatilis*) aus Teichanlagen und Durchlauftanks erwiesen hat (NEDOLUHA und WESTHOFF, 1993, 1995). Bei einer vergleichenden Untersuchung der Keimflora des Magen-Darm-Traktes von wilden und gezüchteten Süßwasserfischen in Spanien (GONZALES et al., 1999) bildeten Aeromonaden 65 % der psychrotrophen Flora in wildem Flußhecht (*Esox lucius*); bei der Meerforelle (*Salmo trutta*) waren Carnobakterien mit 40 % der psychrotrophen Isolate die dominante Gruppe. Im Magen-Darm-Trakt (MDT) von gezüchteten Regenbogenforellen fanden sich hohe Keimzahlen (ca. 45 %) von psychrophilen *Bacillus* sp. und coryneformen Bakterien.

Im Darm ist die Keimflora für den Fisch von physiologischer Bedeutung. Der Intestinaltrakt stellt aufgrund von speziellen Umgebungsparametern, wie pH-Wert, Anaerobiose und Gallensalzen, für bestimmte Mikroorganismen eine ökologische Nische dar. Die Funktion der symbiotisch im Darm lebenden Bakterien wird gekennzeichnet durch die Fähigkeit, Algenzellen als Nährstoffquelle für den Fisch zu verdauen (RIMMER und WIEBE, 1987), dem Wirt Aminosäuren und bestimmte Vitamine bereitzustellen (FONG und MANN, 1980; STEFFENS, 1985) und möglicherweise präventiv gegen die Besiedelung des Darmes mit pathogenen Organismen zu wirken (ONARHEIM und RAA, 1990). Es wird angenommen, dass die natürliche Mikroflora des Magen-Darm-Traktes durch die Fähigkeit zur Produktion bestimmter Enzyme und antibakterieller Substanzen eine Rolle beim Verdau von Makromolekülen und bei der Prävention vor pathogenen Bakterien spielen kann (CAMPBELL und BUSWELL, 1983; SUGITA et al. 1997). WESTERDAHL et al. (1991) stellten bei 28 % der aus dem Magen-Darm-Trakt von Steinbutt (*Scophthalmus maximus*) isolierten Keime eine Hemmwirkung auf einen *Vibrio anguillarum*-Stamm fest. Diese Keime waren zu 93 % gramnegativ und sensitiv gegen das Vibriostatikum O 129, so dass es sich womöglich um andere *Vibrio*-Arten handelte. In diesem Zusammenhang ist weiterhin bekannt, dass Aeromonaden, *Bacteroidaceae* und Clostridien Amylasen und Proteasen erzeugen und somit bei der Kohlenhydrat- und Eiweißverdauung im Darm des Fisches mitbeteiligt sein können, und dass Milchsäurebakterien und Carnobakterien in der Lage sind, Bakteriozine und andere Bakterien-hemmende Substanzen zu erzeugen (VENOGUPAL, 1990; SUGITA et al., 1997; RINGØ et al., 2000).

### 2.3.2.2 Veränderung der mikrobiologischen Flora während der Lagerung

Es wird angenommen, dass ca. 10 % des weltweiten Fangaufkommens durch bakteriellen Verderb verloren gehen (JAMES 1986, zitiert von FRASER und OMAR, 1998b). Die Geschwindigkeit des Verderbs von Fisch ist abhängig von einer optimalen Kühlung unmittelbar nach dem Fang und von der klimatischen Herkunft des Fisches. Eine sofortige Kühllagerung in Eis verlangsamt das bakterielle Wachstum. Fische aus tropischen Gewässern weisen bei einer Kühllagerung in Eis eine längere Haltbarkeit auf als Fische aus kälteren Gewässern, da ihre vorwiegend mesophile Primärflora bei kälteren Temperaturen in ihrem Wachstum besser gehindert werden kann als eine psychrophile (GRAM et al., 1990; FRASER und SUMAR, 1998b; ICMSF, 1998).

Mit dem Tod des Fisches kommt es zum Erliegen der natürlichen Infektionsabwehr des Körpers, das Immunsystem bricht zusammen und bildet keine natürliche Barriere mehr gegen Keime. Mit zunehmender Lagerungsdauer verändert sich die Primärflora qualitativ und quantitativ zu einer Sekundärflora. Das Eindringen von auf der Oberfläche befindlichen Keimen in das sterile Muskelfleisch kann durch Schuppen, Kiemen oder durch die Haut erfolgen (KARNOP, 1978; TÜLSNER, 1994). Von den Kiemen aus verläuft eine Infektion über das Gefäßsystem und die Nieren in die Bauchhöhle und ins Fleisch. Im Gegensatz zu den Kiemen, die für Bakterien ein gutes Wachstumsmedium darstellen und ihnen ein leichtes Eindringen in das Fischinnere bieten, ist ein Eindringen durch die Haut wesentlich schwieriger. RUSKOL und BENDSEN (1992) wiesen erst bei einer Keimbelastung von  $10^6$  KbE/cm<sup>2</sup> auf der Haut auch in der Muskulatur Bakterien mikroskopisch nach. Die Zeitspanne bis zum Durchdringen der Haut ist von der Fischart und deren Hautbeschaffenheit, wie Hautdicke und Schleim, abhängig. Der Schleim einiger Fischarten enthält antimikrobielle Substanzen, z.B. bestimmte Lysozyme oder verschiedene antibiotisch wirksame Peptide, die das Wachstum von Mikroorganismen unterdrücken können und sich somit auch auf die Haltbarkeit des Produktes auswirken (ROBINETTE et al., 1998; ERBAN et al., 2000; SMITH et al., 2000). Der Zusammenhang von Schleimbeschaffenheit, Inhaltsstoffen des Schleimes und Hautdicke wurde auch von anderen Autoren untersucht und diskutiert (MURRAY und FLECHTER, 1976; HJELMLAND et al., 1983; HUSS, 1995). Eine ausgeprägte Beweglichkeit der Bakterien begünstigt ihre Fähigkeit, die Haut zu durchdringen, ihre proteolytischen Eigenschaften sind

dabei nicht entscheidend. Pseudomonaden und Shewanellen sind besonders beweglich, während *Acinetobacter*, *Flavobacterium* und *Micrococcus* nur selten in die Muskulatur übertreten können.

Weiterhin ist die Schnelligkeit der Bakterieninvasion in die keimfreie Muskulatur des Fisches abhängig von der Art und der Größe des Fisches und wird durch die Fangmethode, durch unzureichende Kühlung, verzögertes Ausnehmen, mechanische Behandlung wie das Filetieren oder durch eine unzureichende Hygiene bei der Verarbeitung begünstigt (CHEN und CHAI, 1982; WARD und BAJ, 1988). Durch betriebshygienische Maßnahmen kann die Entwicklung der Sekundärflora verzögert werden. Dazu gehören konsequente Kühlung, Verwendung steriler Arbeitsgeräte, Ausweiden und sorgfältiges Waschen der Fische.

Für den bakteriellen Verderb ist in erster Linie die psychrotrophe Flora, die während einer Lagerung von Fisch bei Kühlschranktemperaturen dominiert, verantwortlich (SHEWAN und MURRAY, 1979; HOBBS, 1990). Am Ende der Lagerfähigkeit werden Keimzahlen von  $10^8$ - $10^9$  KbE/cm<sup>2</sup> oder g auf der Haut und in der Muskulatur nachgewiesen. Bei Lagerungsversuchen mit Frischfisch muss ein klarer Unterschied zwischen den spezifischen Verderbniserregern („specific spoilage organisms - SSO“) und der vorhandenen gesamten Verderbsflora gemacht werden. Um diese Keime voneinander zu unterscheiden, werden sensorische, mikrobiologische und chemische Untersuchungen zur genaueren Charakterisierung und Differenzierung herangezogen (GRAM und HUSS, 1996). Die Bakterien werden nach einer sensorischen Verlaufsuntersuchung zum Zeitpunkt der sensorischen Zurückweisung des Produktes („rejection time“) isoliert und auf ihre Fähigkeit zur Bildung von typischen abweichenden Geruchs- und Geschmackskomponenten untersucht. Dazu wird anhand von steriler Fischmuskulatur oder steriler Fischbouillon die Verderbsaktivität der entsprechenden Keime, d.h. deren Fähigkeit, die zum Verderb führenden Stoffwechselprodukte in ausreichenden Mengen zu produzieren, ermittelt. Abbildung 1 zeigt den Zusammenhang zwischen der Gesamtkeimzahl, den spezifischen Verderbniserregern und chemischen Komponenten (Trimethylamin-TMA) bei der Eislagerung von Seefischen.

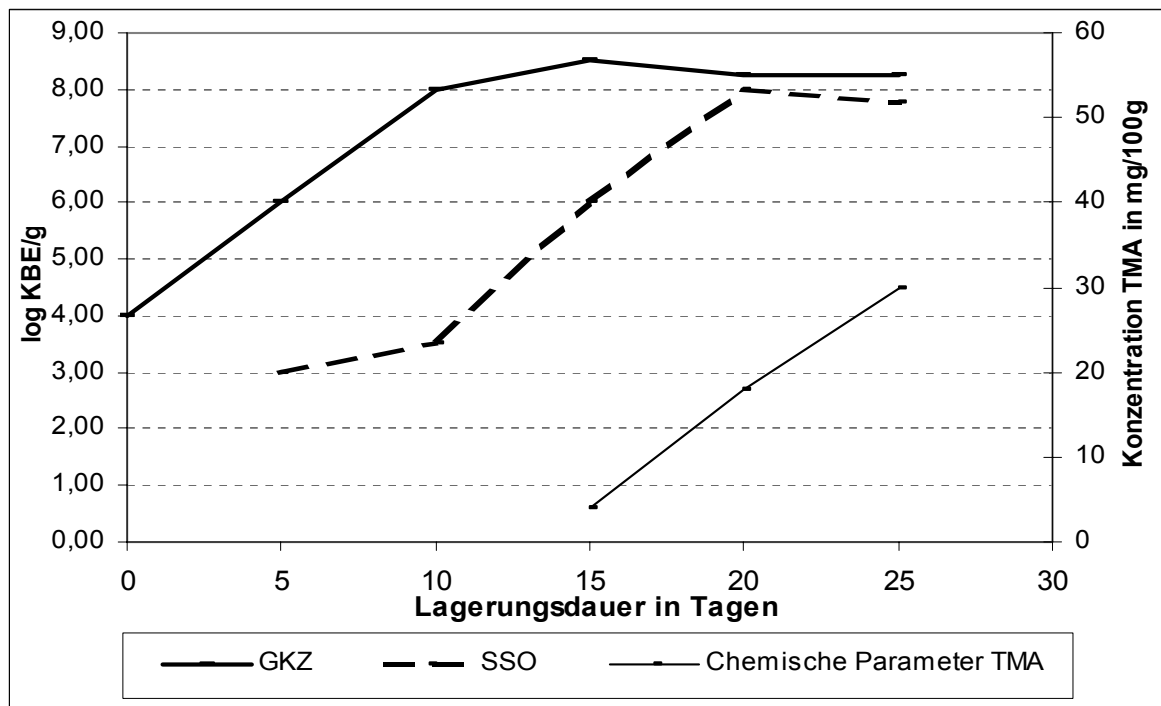


Abbildung 1: Entwicklung der Gesamtkeimzahl (GKZ), der spezifischen Verderbskeime (SSO, specific spoilage organism) und des chemischen Verderbsindikators Trimethylamin (TMA) in Fischen während der Eislagerung (modifiziert nach GRAM, 1996).

Nach der Empfehlung des ICMSF (1986) für mikrobiologische Kriterien für frischen Rohfisch darf bei keiner von 5 Stichproben eine aerobe Gesamtkeimzahl (GKZ) von  $1 \cdot 10^7$  KbE/g oder  $\text{cm}^2$  überschritten werden, und nicht mehr als 3 der Proben dürfen eine Keimzahl zwischen  $5 \cdot 10^5$  und  $1 \cdot 10^7$  KbE/g oder  $\text{cm}^2$  aufweisen ( $n = 5$ ,  $c = 3$ ,  $m = 5 \cdot 10^5$ ,  $M = 1 \cdot 10^7$ ).

Auf der Haut wurden in Untersuchungen an eisgelagerten Fischen nach 8-10 Tagen Lagerung Gesamtkeimzahlen von  $1 \cdot 10^7$  KbE/ $\text{cm}^2$  erreicht, womit der Grenzwert der ICMSF überschritten wurde. In der Muskulatur blieb die GKZ jedoch teilweise bis zum 21. Tag unter  $5 \cdot 10^5$  KbE/g (SCOTT et al., 1992; RYDER et al., 1993). In diesen Untersuchungen wurde die Vermehrung von Keimen auf Langschwanz-Seehecht (*Macruronus novaezelandiae*) und auf Doryfisch (*Pseudocyttus maculatus*), einem Tiefseefisch der Familie der Petersfische, in drei Phasen beschrieben: einer typischen anfängliche Verzögerungsphase (lag-Phase), darauf folgend eine Phase mit exponentiellem Wachstum und schließlich einer stationären Phase. Bei einer Keimbestimmung an eisgelagerten Wittlingen waren am Ende der Lagerungszeit nach 13 Tagen ähnliche Ergebnisse mit Gesamtkeimzahlen auf der Haut von  $10^7$ - $10^8$

KbE/cm<sup>2</sup> nachweisbar. Das Gewebe war bis zum 5. Tag steril und hatte bei Versuchsende eine Keimzahl von 10<sup>6</sup> KbE/g (MEYER und OEHLenschläGER, 1996). Bedeutend höher waren die GKZ in einer Untersuchung an Sardinen (*Sardina pilchardus*) (ABABOUCH et al., 1991). Bereits fangfrische Fische hatten auf der Haut eine Keimbelastung von 2,5\*10<sup>6</sup> KbE/cm<sup>2</sup>. Die Bakterien drangen schnell in die Muskulatur ein und erreichten nach 24 Stunden bei einer Lagerung bei Raumtemperatur eine Keimzahl von 5\*10<sup>8</sup> KbE/g und nach 8 Tagen Eislagerung eine Keimzahl von 6\*10<sup>8</sup> KbE/g.

### 2.3.2.3 Bedeutende Verderbniserreger auf Fischen

Die wichtigsten Verderbskeime auf Seefischen werden unter anderem durch ihre Fähigkeit charakterisiert, Trimethylaminoxid (TMAO) zu Trimethylamin (TMA) zu reduzieren und H<sub>2</sub>S zu bilden und somit off-odour und off-flavour zu produzieren (GRAM, 1992). In der Regel werden Keimzahlen der spezifischen Verderbniserreger SSO von 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> KbE/g benötigt, um durch abweichende Stoffwechselprodukte zum Verderb des Fisches zu führen.

Je nach Herkunft der Fische und nach Lagerungstemperatur bildet sich die Verderbsflora unterschiedlich aus. Bei einer aeroben Eislagerung besteht sie bei Fischen tropischer, subtropischer und gemäßigter Zonen hauptsächlich aus *Pseudomonas* ssp. und insbesondere bei Seefischen aus *Shewanella putrefaciens*. Bei wärmeren Lagerungstemperaturen bilden mesophile *Vibrionaceae* zu einem großen Anteil die Verderbsflora (GRAM et al., 1990). Wenn die Tiere aus verschmutzten Gewässern stammen, werden bei ihrem Verderb oft mesophile *Enterobacteriaceae* nachgewiesen (HUSS, 1995). Diese Keime spielen vor allem bei Fischprodukten eine Rolle und können durch Kontamination bei der Bearbeitung zum Verderb des Produktes beitragen (LYHS et al., 1998). Neben Lactobacillen fanden TRUELSTRUP HANSEN et al. (1995) beim Verderb von vakuumverpackten kaltgeräucherten Lachsen (*Salmo salar*) in geringen Mengen auch *Enterobacteriaceae*. In einer Untersuchung von GORCZYCA et al. (1985) bildeten bei höheren Lagerungstemperaturen bewegliche Aeromonaden (*A. hydrophila*) die Hauptverderbnisflora auf aerob gelagerten Regenbogenforellen.



### 2.3.2.3.1 *Shewanella putrefaciens*

Shewanellen sind gramnegative, bewegliche Stäbchen. Zu diesem Genus werden die Species *Sh. putrefaciens*, *Sh. baltica* und *Sh. alga* gezählt (ZIEMKE et al., 1998). *Shewanella putrefaciens* wächst bei einer optimalen Temperatur zwischen 20°C und 25°C, aber auch bei 0°C, vorzugsweise auf Medien mit 6,5 % NaCl-Gehalt (BAUMGART, 2001). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass *Shewanella putrefaciens* eines der wichtigsten Bakterien beim Verderb von Seefisch bei 0°C ist (CHAI et al., 1968; HOBBS und HODGEKISS, 1982; GRAM et al., 1987). Die taxonomische Einordnung wurde im Laufe der Jahre mehrmals geändert. Ursprünglich wurde *Shewanella* als *Achromobacter* bezeichnet, später zu den Pseudomonaden gerechnet, dann in den Genus *Alteromonas* eingeordnet (LEE et al., 1977). Aufgrund von genetischen Untersuchungen wurde es in eine eigenständige Gruppe eingeteilt, MAC DONELL und COLLWELL schufen 1985 das neue Genus *Shewanella*. Shewanellen sind in der Lage, H<sub>2</sub>S aus schwefelhaltigen Aminosäuren zu bilden. Geeignete Medien für die Isolierung dieser Keime, wie Eisen-Agar (GRAM et al., 1987) oder Lyngby-Agar von Oxoid, enthalten Eisencitrat, Thiosulfat und L-Cystein, so dass es beim Wachstum durch die Bildung von H<sub>2</sub>S zu einer FeS-Präzipitation kommt, erkennbar durch die Schwärzung der Kolonien.

In einer Untersuchung von JØRGENSEN et al. (1988) an eisgelagertem Kabeljau (*Gadus morhua*) zeigte sich eine starke negative Korrelation der Keimzahl von *Sh. putrefaciens* mit der verbleibenden Haltbarkeit des Fisches, so dass die Keimzahl einen guten Indikator für die restliche Lagerfähigkeit darstellte. *Sh. putrefaciens* ist bei Sauerstoffausschluss in der Lage, sich auch unter anaeroben Bedingungen, durch die Nutzung des Sauerstoffs aus TMAO, bis zu Keimzahlen von 10<sup>6</sup> bis 10<sup>8</sup> KbE/g zu vermehren; das Wachstum von Pseudomonaden wird dagegen unterbunden (RINGØ et al., 1984).

### 2.3.2.3.2 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonaden sind obligat aerobe, polar begeißelte, nicht sporenbildende gramnegative Stäbchenbakterien. Ihre minimale Vermehrungstemperatur beträgt -3 bis 0°C. Da einige Arten Pigmente, insbesondere Fluoreszein, synthetisieren, lässt sich die Gattung *Pseudomonas* (*P.*) in die Gruppe der fluoreszierenden und der nicht fluoreszierenden Pseudomonaden unterteilen. Einige Arten gelten als primärpathogen für Fische, wie *P. fluoreszenz* oder *P. anguilliseptica* (SIESENOP und BÖHM, 2000). Pseudomonaden sind in der Umwelt weit verbreitet und kontaminieren Lebensmittel verschiedener Herkunft. Sie nutzen Substrate für ihr Wachstum aus einer Reihe von Materialien, verstoffwechseln die Nicht-Protein-Nitrogen-Fraktion aus tierischen Lebensmitteln und setzen durch Proteasen und Lipasen Aminosäuren und Fettsäuren frei, aus deren Abbau off-odours und off-flavours resultieren. Sie sind besonders beweglich und leicht anpassungsfähig und können aufgrund ihrer proteolytischen Eigenschaften v.a. beim aeroben Fischverderb schnell die dominante Flora bilden (HUIS IN'T VELD, 1996). Nach Untersuchungen von TÜLSNER (1994) steigt der Anteil von *Pseudomonas*-Arten auf Fisch von 22 % nach dem Fang auf 80 % bei der Anlandung. Tabelle 4 zeigt die qualitative Veränderung der bakteriellen Flora auf der Haut des Fisches nach dem Fang während der Lagerung auf Eis.

Tabelle 4: Qualitative Veränderung der bakteriellen Flora des Fisches nach dem Fang bei der Lagerung in Eis (nach Tülsner, 1994).

Keimart	Anteil der Keimart an der Gesamtkeimzahl in %		
	Fang	Fischraum	Anlandung
<i>Pseudomonas</i>	22	60	80
<i>Achromobacter</i>	60	20	6
<i>Flavobacterium</i>	7	-	6
<i>Micrococcus</i>	6	12	2
<i>Acrobacter</i>	4	-	-
<i>Bacillus</i>	2	8	6

Pseudomonaden verdrängen auch bei Süßwasserfischen während der Lagerung die anderen Arten (SAUPE, 1996). ACUFF et al. (1984) stellten auf aus Teichen stammenden Tilapia (*Tilapia aurea*) eine psychrotrophe Anfangskeimbelastung von  $\log 2,86 \text{ KbE/cm}^2$  fest, die nach 19 Tagen mit Keimzahlen von  $\log 7,8 \text{ KbE/cm}^2$  von

Pseudomonaden dominiert wurde. STENSTRÖM und MOLIN (1990) identifizierten von insgesamt 159 Stämmen, die beim Verderb von kühl gelagerten Fischen aus dem Handel isoliert wurden, 38 % als *Shewanella putrefaciens* und 46 % als Pseudomonaden, davon 30 % als *P. fragi*, welches fruchtig riechende Verbindungen beim Abbau von Fischgewebe erzeugt.

Im Zusammenhang mit der Konkurrenz von Pseudomonaden und Shewanellen beim Fischverderb wird die Eigenschaft von Pseudomonaden diskutiert, eine hemmende Wirkung auf andere Bakterien, insbesondere auch auf *Aeromonas sobria*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* und *Shewanella putrefaciens*, auszuüben. Diese ist zurückzuführen auf die Fähigkeit von Pseudomonaden, Eisen-Chelate mit hoher Affinität, sog. Siderophore, zu bilden. Unter eisenarmen Verhältnissen sind sie entscheidend bei einem Wettkampf der miteinander konkurrierenden Bakterien um Eisen (GRAM, 1993; GRAM, 2002). In diesem Zusammenhang wird auch die Fähigkeit von Pseudomonaden diskutiert, ein Teil des natürlichen Abwehrsystems von Fischen zu sein, da sie durch die Siderophore-Bildung eine hemmende Wirkung auf fischpathogene Aeromonaden ausüben können.

### 2.3.3 Chemische Parameter des Verderbs

Die durch autolytische Prozesse nach dem Rigor mortis entstandenen niedermolekularen Verbindungen und leicht löslichen Proteine stehen den Verderbniserregern als reiche Nährstoffquelle zur Verfügung. Verschiedene Proteasen und andere hydrolytische Enzyme der psychrophilen und psychrotrophen Organismen können im Fischmuskel auch bei niedrigen Temperaturen sekretiert werden und zu Abbauprozessen führen (VENUGOPAL, 1990). Proteine werden durch bakterielle Proteasen zu Peptiden und Aminosäuren und letzten Endes in Indole, Amine, Säuren und ihre Stickstoff- und Schwefelbestandteile abgebaut. Lipasen bauen Lipide in freie Fettsäuren, Glycerin und andere Fettkomponenten ab.

Diese Verbindungen werden sensorisch vom Verbraucher wahrgenommen und führen gegen Ende der Lagerung zur Ablehnung des Produktes. Durch physikochemische Untersuchungen können diese Abbauprodukte in der Fischmuskulatur nachgewiesen werden. Derartige Untersuchungen dienen zur Objektivierung und zur Festigung von Sensorikbefunden. Dazu zählen die

Bestimmung des Gehaltes an flüchtigen Aminen wie Monomethylamin (MMA), Dimethylamin (DMA), Trimethylamin (TMA) und flüchtigen Stickstoffbasen (TVB-N), die Konzentration von Hypoxanthin und anderen Stoffwechselabbauprodukten, der K-Wert und die Bestimmung von biogenen Aminen (TESKEREDZIC und PFEIFER, 1997).

Tabelle 5 zeigt die wichtigsten Verderbniserreger bei Fisch und die Verbindungen, die durch bakterielle Abbauvorgänge aus den Nährstoffen des Fischgewebes entstehen.

Tabelle 5: Bakterielle Verderbskomponenten (nach Church, 1998)

Spezifische Verderbnisbakterien	Verbindungen
<i>Shewanella putrefaciens</i>	TMA, H <sub>2</sub> S, CH <sub>3</sub> SH, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S, HX
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (v.a. in VP)	TMA, HX
<i>Pseudomonas</i> spp.	Ketone, Aldehyde, Ester, Nicht-HS-Sulphide
<i>Vibrionaceae</i>	TMA, HS
Aerobe Verderbniserreger	NH <sub>3</sub> , Essig-, Butan- und Propionsäure

TMA = Trimethylamin; HS = Hydrogensulphid; CH<sub>3</sub>SH = Methylmercaptan; (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S = Dimethyl-sulphid; HX = Hypoxanthin; NH<sub>3</sub> = Ammoniak; VP = Vakuumverpackung

Werden chemische Parameter zur Bestimmung der Frische der Fischware herangezogen, so sind für die Entwicklung und Höhe der Amingehalte in der untersuchten Fischmuskulatur die Ausgangswerte entscheidend, die im Fisch zum Fangzeitpunkt nachgewiesen werden. Sie bestimmen den weiteren Verlauf der chemischen Parameter. Die Ausgangswerte können erhebliche Unterschiede aufweisen, da sie von vielen Faktoren, wie Fischart, Fangart, Jahreszeit, Fanggebiet, Ernährungszustand, Reifegrad, Geschlecht und Schleppzeit, abhängig sind. Ihre Kenntnis ist wichtig, um zum Zeitpunkt der Untersuchung mit Hilfe der ermittelten Analysedaten Aussagen über die Frische des Fisches treffen zu können (OEHLENSCHLÄGER, 1989).

Eine oft benutzte Methode ist die Bestimmung des TVB-N-Gehaltes in der Fischmuskulatur. TVB-N (Total volatile basic nitrogen) ist eine Mischung aus flüchtigen Aminen. Nach NIEPER und STOCKEMER (1986) ist sie neben der organoleptischen Untersuchung die Methode der Wahl bei der Bestimmung der Genusstauglichkeitsgrenze bei den meisten Fischarten. Der TVB-N-Gehalt ist

zunächst niedrig und steigt kurz vor dem Verderb rapide an. Er dient somit als Nachweis des Verderbs in der späten Lagerphase und ist weniger ein Gradmesser für Frische. Wenn die zuvor erfolgte sensorische Untersuchung der Fischereierzeugnisse einen abweichenden Befund erbracht hat, kann nach Anlage 3, Kapitel 3 der Fischhygieneverordnung die Untersuchung auf flüchtige Basenstickstoffe zur Befundsicherung durchgeführt werden. ABABOUCHE et al. (1996) geben die Grenze der Genusstauglichkeit für Fische der nördlichen Breitengrade mit 25 bis 30 mg TVB-N/100 g an, wohingegen HUSS (1988) diese Grenze mit 30 bis 35 mg TVB-N/100 g höher festsetzt.

Laut PRIEBE (1984) wird gegenwärtig bei Seefischen die Bestimmung von TMA oder der Summe an TVB-N am häufigsten verwendet, um mit Hilfe eines Laborwertes den Frischegrad des Fischgewebes abschätzen zu können. Besonders bei Magerfischen besteht eine gute Korrelation zwischen dem Sensorikbefund und dem Gehalt an TMA und TVB-N Substanzen. Weniger gute Beziehungen konnten hingegen bei halbfetten und fetten Fischen festgestellt werden. ACUFF et al. (1984) stellten bei in einer Teichwirtschaft gezüchteten Tilapia (*Tilapia aurea*) einen anfänglichen TVB-N-Gehalt von 15,6 mg/100 g fest, der nach 12 Tagen Lagerung in Eis, dem Ende der Haltbarkeit, auf 26,2 mg/100 g anstieg. Zu diesem Zeitpunkt erreichte die oberflächliche Keimzahl der gramnegativen Flora Werte um  $10^6$  KbE/cm<sup>2</sup>.

Fische besitzen einen einzigartigen osmoregulatorischen Mechanismus, um Dehydration in der marinen Umgebung zu verhindern. Ein wichtiger Osmoregulant ist TMAO, das mit einer Konzentration von bis zu 1 % in Knochenfischen und bis zu 1,5 % in Knorpelfischen vorkommt (CHURCH, 1998; FRASER und OMAR, 1998b). In Seefischen findet sich TMAO in Mengen um 1 bis 5 % des Muskelgewebes (Trockengewicht), bei Süßwasserfischen ist TMAO in der Regel kaum nachweisbar (BØRRESEN, 1995). Gramnegative Organismen, v.a. *Shewanella putrefaciens*, können durch die Reduktion des TMAO zu TMA Energie gewinnen. Dagegen ist *Pseudomonas* spp. nicht in der Lage, TMAO als terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen und produziert kein TMA auf verderbendem Fisch (GRAM und MELCHIORSEN, 1996). Die Reduktion von TMAO zu TMA ist auch vom pH-Wert und von der Gesamtkondition des Fisches nach dem Tod abhängig. Der Zusammenhang zwischen der Gesamtkeimzahl, der Verderbsflora und dem Gehalt an

stickstoffhaltigen Verbindungen im Fischmuskel bei der Eislagerung ist in der Abbildung 2 dargestellt.

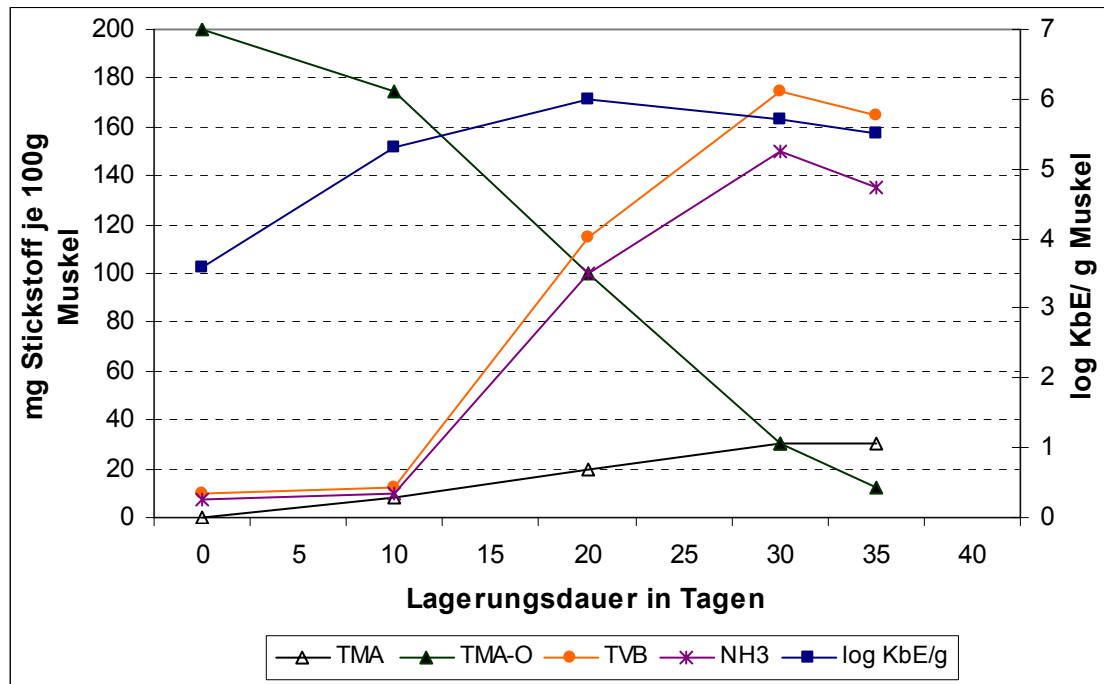


Abbildung 2: Entwicklung der Keimzahl sowie des Gehaltes von TMA und einzelner Stickstoffbasen in mg Stickstoff je 100 g bei der Eislagerung von Dornhai (nach TÜLSNER, 1994).

Einige endogene Enzyme im Fischgewebe sind in der Lage, TMAO zu Dimethylamin (DMA), Monomethylamin (MMA) und Formaldehyd (FA) zu reduzieren. TMAO ist auch in der Nahrung der Fische zu finden, es ist geruchsneutral und ungiftig, TMA hingegen ist ein Bestandteil des abweichenden Geruchs bei verderbendem Fisch. Die Reduktion von TMAO erfolgt im Muskelgewebe parallel zur Verschlechterung des Frischezustandes. Zunahmen werden ab dem 7. Eislagerungstag, deutlicher vom 12. Tag an festgestellt. Aus diesem Grunde wird die Höhe der TMA-Konzentration oft als Indikator für den bakteriellen Verderb herangezogen. Von Wissenschaftlern werden unterschiedliche Grenzwerte, die den Verderb bestimmen, festgelegt. Huss (1988) geht von einer guten Qualität von Fischfleisch aus bei einer Konzentration von < 1,5 mg TMA/100 g, während er 10 bis 15 mg TMA/100 g als Akzeptanzgrenze ansieht. ABABOUC et al. (1996) hingegen zählen Fische mit weniger als 1 mg TMA/100 g zur ersten Klasse und setzen die Grenze der Verzehrsfähigkeit bei Sardinen etwas niedriger an mit 5 bis 10 mg TMA/100 g.

Für Fischarten ohne oder mit geringem Gehalt an TMAO ist diese Methode ungeeignet. Deshalb sind flüchtige basische Stickstoffverbindungen beim Süßwasserfisch erst dann messbar, wenn er sensorisch bereits verdorben ist (LEUPOLD, 1997). Auch RODRIGUEZ et al. (1999) gehen davon aus, dass eine Bestimmung des TMA- Gehaltes bei Regenbogenforellen aufgrund des verschwindend geringen Gehaltes an TMAO in der Muskulatur nicht nützlich ist.

### 2.3.4 Humanpathogene Organismen bei Frischfisch

#### 2.3.4.1 Übersicht - fakultativ und obligat humanpathogene Bakterien

Huss (1995) unterteilt Mikroorganismen in zwei Gruppen (Tabelle 6), in endemische und in nicht endemische Organismen. Vertreter der ersten Gruppe kommen natürlicherweise in der aquatischen Umwelt des Fisches vor und sind ubiquitär im Wasser oder im Schlamm enthalten. Die Vertreter der zweiten Gruppe werden durch Verschmutzungen in das Wasser eingetragen oder gelangen während des Produktionsprozesses in oder auf den Fisch. Pathogene Organismen werden sowohl den endemischen als auch den nicht endemischen Bakterien zugeordnet. Nicht alle Arten der genannten Bakterien sind pathogen.

Tabelle 6: Pathogene Bakterien bei Meerestieren (modifiziert nach Huss, 1995)

<b>Gruppe 1:</b> Endemische Bakterien	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Vibrio</i> spp. <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Plesiomonas shigelloides</i> , <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>
<b>Gruppe 2:</b> nicht-endemische Bakterien, durch äußere Kontaminationsquelle z.B. Fäkalien	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Campylobacter</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i>
<b>Gruppe 3:</b> Bakterien, die während der Verarbeitung in/auf das Lebensmittel gelangen	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>

Für den Menschen pathogene Keime können durch fäkal kontaminiertes Wasser auf Fischereierzeugnisse übertragen werden und sind oftmals vor allem in Binnen- und Küstengewässern zu finden. Die Ursache hierfür ist häufig das Einleiten ungeklärter Abwässer in Flüsse und Seen. Auf diesem Wege gelangen Enterokokken, *Escherichia coli*, Salmonellen und Shigellen ins Wasser (SAUPE, 1989). WARD (1989)

zitiert eine Arbeit, in der nachgewiesen wurde, dass sich in Fischen, die in Teichen mit einem Abwasserzulauf gehalten wurden, Fäkalkeime ansammelten. Ab einer Belastung von  $10^4$  KbE/ml Wasser waren diese Bakterien auch in der Fischmuskulatur nachweisbar. Im weiteren wird auf diejenigen Bakterien eingegangen, die im methodischen Teil der Arbeit als Untersuchungskeime gedient haben. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht dieser Keime.

Tabelle 7: Bakterien als Gesundheitsrisiken beim Verzehr von Fischereierzeugnissen (nach Feldhusen, 1999)

Keim	min. Infektionsdosis	Symptome	Kontaminierte Fischereierzeugnisse	Vorkommen und Bedeutung
<i>Clostridium botulinum</i> Typ E	0,1 – 1 µg Toxin tödlich	Schwäche, Sehstörung, Tod durch Atemlähmung, Herzstillstand	Sporen auf Oberfläche, in Darm, Kiemen; vakuum-verpackte Räucher-fische, Konserven	Weltweit, ubiquitär in Aquakulturen, See- und Süßwasser, geringes Risiko bei Einhaltung der Kühlkette (Toxinbildung ab 3,3°C); Botulismus selten
<i>Clostridium perfringens</i>	$10^6$ - $10^8$ KbE/g	Durchfall, selten Tod	Sporadisch	Einige Fälle in USA
<i>Salmonella</i> spp.	je Pathogenität ab $10^2$ KbE/g	Erbrechen, Durchfall, Fieber, selten Tod	Im Darm; Garnelen, Weichtiere, Aal und Welsen	Weltweit durch fäkale Kontamination, Risiko wegen Erhitzung i.d.R. gering
<i>Vibrio cholerae</i> Serovar O1, O139	$10^3$ bis $10^8$ - $10^9$ KbE/g	Cholera	Garnelen, Muscheln, Tintenfisch, Meeresfrüchte	Epidemien in Asien, Afrika, Südamerika, geringes Risiko für gesunde Menschen
<i>Vibrio</i> Non-O1		Milde Gastroenteritis		Geringes Risiko für gesunde Menschen
<i>Vibrio parahämolyticus</i> (Kanagawa-pos.)	$10^5$ - $10^6$ KbE/g	Durchfall, Übelkeit, Erbrechen	Küstenbereichsediment Plankton, im Wasser bei wärmeren Temp., Fisch, Muscheln, Krustentiere, auf Haut, Kiemen, MDT	Häufigste Ursache für Vibrionen –LM-Infektionen in bestimmten Weltregionen (Indien, Japan, Südostasien)
<i>Vibrio vulnificus</i>		Wundinfektion, Tod durch Septikämie	Europa?, Wasser ab 20°C, Fisch, Austern, Muscheln, Garnelen	In Deutschland keine Fälle durch Fischverzehr, sonst Infektionen durch Verzehr in USA
<b>LISTERIA MONOCYTOGENES</b>	Ab 100 KbE/g bei Risikogruppen	Akut-septikämisch bei Neugeborenen, Meningitis	Ubiquitär, 3-10% Menschen als Träger, selten Meerwasser, kalt u. heißgeräuchert, Salzfischerzeugnisse, roher Fisch, Austern, Garnelen, Muscheln	Infektionen in Verbindung mit Fischereierzeugnissen sehr selten, geringes Risiko



#### 2.3.4.2 *Vibrio* spp.

Vibrionen sind gramnegative, fakultativ anaerobe leicht gebogene Stäbchenbakterien mit einer oder mehreren polar angeordneten Geißeln. Sie kommen natürlicherweise häufig in wärmeren Gewässern, in den Mündungstrichtern großer Flüsse, den Küstengebieten der Meere (Lagunen) und in Oberflächenwasser v.a. tropischer Gewässer vor (BOCKEMÜHL, 1992; KRÄMER, 1998). Ihre Ausbreitung ist jedoch von Jahreszeit und Klimazone abhängig. Es wird von einer positiven Korrelation zwischen der Wassertemperatur und der Nummer der isolierten humanpathogenen Vibrionen aus Meerestieren wie auch der Zahl der Erkrankungen bei Menschen ausgegangen (DALSGAARD, 1998). Nach BRENNER et al. (1988) und HUSS (1995) bilden Vibrionen die dominante Keimflora bei Salzwasserfischen. Innerhalb des Genus *Vibrio* sind 30 Arten bekannt, davon sind 12 für Mensch und Tier fakultativ oder obligat pathogen (FELDHUSEN, 1999). Die für den Menschen als Lebensmittelvergifter bedeutendsten sind *V. cholerae* Biotyp O1, *V. cholerae* non-O1 bzw. O 139 und die halophilen Vibrionen *V. parahaemolyticus* (Kanagawa positiv) und *V. vulnificus*. Diese benötigen für ihre Vermehrung eine Kochsalz-Konzentration, die in der Regel in den Küstengewässern der Ozeane vorherrscht (Optimum 1-3 %, Minimum 0,1-0,5 %). Für das Wachstum sind höhere Temperaturen notwendig, so dass Lebensmittel-Vergiftungen vor allem im Sommer bzw. nach dem Verzehr von Meeresfrüchten aus wärmeren Gewässern berichtet werden. Besonders Muscheln und Krebstiere gelten als Reservoir für Vibrionen, sie werden aber auch bei pelagischen Fischen gefunden (DE PAOLA et al., 1994). Dort siedeln sie sich bevorzugt im Darm an, der eine besonders geeignete Nische für diese Keimart darstellt (LARSEN, 1978; MACFARLANE, 1986; THAMPURAN und SURENDRAN, 1998). Sie besitzen die Fähigkeit zur Chemotaxis in Richtung Haut, Kiemen und Darmschleimhaut, wo sie sich anheften (BORDAS, 1998). Ihnen wird auch eine physiologische Bedeutung im Darm von Fischen zugesprochen, da sie im Darm organische Verbindungen mineralisieren können (COLWELL et al., 1977).

*V. cholerae* wurde als Erreger der klassischen Cholera 1883 von Robert Koch identifiziert und ist eng verwandt mit dem ebenfalls Cholera verursachenden *V. eltor*. Erkrankungen mit diesem Biovar verlaufen etwas leichter als mit dem Biovar *V. cholerae*, der Erreger wird aber nach der Erkrankung eine längere Zeit im Stuhl ausgeschieden und ist resistenter gegen Umwelteinflüsse als *V. cholerae*. Die

notwendige Infektionsdosis einer Erkrankung mit *V. cholerae* beträgt  $10^6$  Erreger. Diese können sich im Dünndarm an das Epithel der Schleimhaut anheften und vermehren sich schnell im alkalischen Milieu, ohne in die Epithelzellen einzudringen. Durch ein Enterotoxin, das Cholera-toxin, wird beim Patienten Brechdurchfall ausgelöst, dessen Folge aufgrund des hohen Wasser- und Elektrolytverlustes ein lebensbedrohlicher Kollaps sein kann. Der WHO werden jährlich Hunderttausende Choleraerkrankungen gemeldet, 1995 waren es 208 755 Fälle mit einer mittleren Letalität von 2,4 %, d.h. 5034 Todesfälle (KRÄMER, 1998). Cholera-ähnliche Durchfälle werden auch von *V. cholerae* non-O1 ausgelöst. Diese lassen sich nicht mit O1-Serum agglutinieren. Ein weiterer Vertreter der Vibrionen, *V. mimicus*, ist den Cholera-vibrionen biochemisch sehr ähnlich und kann gelegentlich zu vergleichbaren intestinalen Infektionen führen wie *V. cholerae*.

Der halophile *V. parahaemolyticus* wird vor allem im südostasiatischen und pazifischen Raum bei Fischvergiftungen isoliert. In Japan verdoppelte sich 1998 im Vergleich zum Vorjahr die Zahl der durch diesen Erreger ausgelösten Infektionen, übertraf sogar die Häufigkeit der Salmonellosen (ANONYM, 1999) und wurde 1993 nach HONDA & IIDA (1993) in 40 bis 60 % aller bakteriellen Lebensmittelvergiftungen in Japan isoliert. *V. parahaemolyticus* hat sein Wachstumsoptimum bei einer Salzkonzentration von 3 %. Durch den Verzehr unzureichend erhitzter Meeresfrüchte kann sich der Mensch infizieren. Die Erkrankung äußert sich in akutem Brechdurchfall und erhöhter Temperatur. Ausgelöst werden die Symptome durch ein Exotoxin, welches von enteropathogenen Stämmen von *V. parahaemolyticus* gebildet wird. Dieses Toxin bewirkt eine  $\beta$ -Hämolysen auf Medien mit menschlichen Erythrozyten (Kanagawa-Phänomen). Die aus klinischem Material isolierten Stämme besitzen fast alle diese hämolytische Aktivität, während nur 1 bis 2 % der aus nicht-klinischem Material oder aus Lebensmitteln stammenden Isolate Kanagawa-positiv sind (SAKAZAKI, 1986; NICHIBUCHI und KAPER, 1995).

*V. vulnificus* kommt in marinen und in Küstengewässern vor und kann nach dem Verzehr von rohen Meeresfrüchten, v.a. von Austern, oder nach Kontakt mit Seewasser Wundinfektionen und primäre Septikämie mit Folgen wie Hautläsionen und Ulzerationen mit tiefgreifenden Nekrosen an den Extremitäten beim Menschen hervorrufen (HØI et al., 1998). Von außen gelangen die Erreger durch Hautwunden in den Organismus und führen zu sekundären Septikämien. Ein Enterotoxin ist verantwortlich für Durchfälle. HLADY (1997) und BRYAN et al. (1999) gehen davon

aus, dass besonders bei immungeschwächten Personen oder bei Personen mit chronischen Lebererkrankungen in 50 % der Fälle die Erkrankung tödlich verlaufen kann. In den USA wird dieser Erreger als Hauptursache für Todesfälle nach Lebensmittelvergiftungen durch Meeresfrüchte genannt. DEPAOLA et al. (1994) zeigten, dass die Bakteriendichte an *V. vulnificus* im Eingeweideinhalt einiger am Meeresboden lebender Fische an der nordamerikanischen Golfküste, die sich vorwiegend von Weichtieren und Krustazeen ernährten, um 2 bis 5 Logeinheiten ( $10^8$  KbE/100 g) höher war als im umgebenden Brackwasser. Bei einer indischen Untersuchung von frisch gefangenen und auf dem Markt gekauften Seefischen wurde der Erreger im Darm in 16 % bzw. in 17,8 % der Proben mit Keimzahlen von 15 bis  $910 \text{ g}^{-1}$  nachgewiesen (THAMPURAN und SURENDRAN, 1998).

Während der Wintermonate, aus Fischen kälterer Gewässer oder aus gekühlten und gefrorenen Lebensmitteln ist *V. vulnificus* nur schwer oder gar nicht nachweisbar. Bei tieferen Temperaturen ist er als Reaktion auf den temperaturbedingten Stress in der Lage, Formen mit geringer Größe auszubilden, die lebensfähig, aber nicht kultivierbar sind, "viable but non-culturable - VBNC" (OLIVER, 1995; WEICHART und KJELLEBERG, 1996). Neben *V. vulnificus* ist diese Fähigkeit sowohl für andere Vibrionen als auch für einige *Enterobacteriaceae*, Pseudomonaden, Lactobacillen u.a. beschrieben worden.

#### 2.3.4.3 *Aeromonas* spp.

Die Mitglieder des Genus *Aeromonas* spp. sind gramnegative, kurze, gerade sporenlose Stäbchen. Sie sind fakultativ anaerob und haben eine monotrich-polare Begeißelung. Die meisten Arten sind psychrotroph, können sich noch bei Temperaturen von  $0^\circ\text{C}$  bis  $+5^\circ\text{C}$  vermehren und wachsen im Gegensatz zu den meisten *Vibrio*-Arten auch in NaCl-freien Nährmedien. Das Wachstumsoptimum der Aeromonaden liegt bei  $28^\circ\text{C}$ . Die Gattung wird in zwei Teile aufgeteilt, die beweglichen Aeromonaden und die unbeweglichen Arten *A. media* und *A. salmonicida*. Letztere gilt als obligat pathogen für Fische und verursacht die Furunkulose bei geschwächten Salmoniden, welche sich bei einer Infektion in Form von Hautläsionen und septikämischen Erscheinungen äußert.

Zur Zeit zählt man zu der Gruppe der beweglichen Aeromonaden folgende Arten: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. schubertii*, *A. eucrenophila* und

*A. ichthiosmia*. Sie sind ubiquitär in Gewässern zu finden und können in Süßwasser in relativ hohen Konzentrationen vorkommen (Huss, 1995).

Als pathogen für den Menschen gelten insbesondere *A. hydrophila*, *A. sobria* und *A. caviae*, die bei hospitalisierten, schwerkranken Patienten Infekte verursachen können. Durch ein Enterotoxin werden seltene Gastroenteritiden ausgelöst (KAYSER, 1993). Die Infektion kann von Oberflächenwasser und von kontaminierten Lebensmitteln ausgehen. TSAI und CHEN (1996) wiesen *A. hydrophila* bei 22,2 % vom Fisch stammenden Lebensmitteln nach, wobei 79,2 % der Stämme ein Hämolysin und 91,7 % ein Cytotoxin produzierten. Entscheidend für die Pathogenität der *A. hydrophila*- und *A. sobria*-Stämme ist ihre Fähigkeit zur Adhäsion und die Bildung von Enterotoxinen (SCHUBERT, 1992).

Beim Fischverderb bilden Aeromonaden häufig einen Teil der Verderbsflora und wurden auch als die verantwortlichen Verderbniserreger identifiziert. So zeigte sich, dass Aeromonaden beim Verderb von Süßwasserfischen bei höheren Lagerungstemperaturen eine Rolle spielen (GORCZYCA et al. 1985). Bei einer Lagertemperatur von 37°C betrug die Haltbarkeit von Regenbogenforellen 8 bis 10 Stunden. Zum Zeitpunkt der sensorischen Feststellung des Verderbs bestand die Verderbsflora zu 49 % aus *A. hydrophila*. Auch HASSAN et al. (1994) isolierten auf Süßwasserfischen, die ohne Eis auf dem Markt gehandelt wurden, in 85 % der Proben fakultativ pathogene Mikroorganismen. Den größten Teil bildete *Aeromonas* spp. (69 %) neben *Vibrio* spp., *Plesiomonas shigelloides* und *Escherichia coli*. Aeromonaden als spezifische Verderbskeime wurden auch von GRAM et al. (1990) beim Verderb von Nilhecht (*Lates niloticus*) bei höheren Lagerungstemperaturen (20 bis 30°C) identifiziert.

In der Schweiz stellten GOBAT und JEMMI (1993) hohe Kontaminationsraten an pathogenen Aeromonaden bei Räucherlachs fest. 10,9 bis 14,3 % der heiß- und kaltgeräucherten Proben und 10,5 % der Gravedlachs-Proben erwiesen sich als positiv. Der Grund hierfür könnte in einer möglichen Rekontamination der gekochten oder heißgeräucherten Ware während der weiteren Verarbeitung wie Filetieren und Verpacken zu finden sein. Es handelte sich bei 61,3 % der identifizierten Stämme um *A. hydrophila*, bei 22,5 % um *A. caviae* und bei 16,3 % um *A. sobria*.

#### 2.3.4.4 *Pseudomonas* spp.

Auch in der Gruppe der Pseudomonaden finden sich einige für den Menschen pathogene Arten. Die humanmedizinisch bedeutsamste ist *P. aeruginosa*, welches häufig im Erdboden, im Oberflächenwasser, auf Gemüse und Obst zu finden ist (KRÄMER, 1997). Eine Infektion kann sich v.a. bei Personen mit Defekten in der spezifischen und unspezifischen Abwehr manifestieren. *P. aeruginosa* ist in der Lage, sich im feuchten Milieu, das nur Spuren von Nährsubstraten enthält, zu vermehren und ist äußerst resistent gegen Umwelteinflüsse. Pseudomonaden machen den größten Teil der Primärflora von Fischen aus und bilden auch beim bakteriellen Verderb von See- und Süßwasserfischen bei Kühlagerung die Hauptverderbnisflora.

#### 2.3.4.5 Clostridien

Clostridien sind anaerobe, grampositive bis gramvariable, peritrich begeißelte Stäbchen. Sie kommen ubiquitär sowohl als Sporen als auch als vegetative Zellen im Erdboden und in den Sedimenten von Seen, Fließgewässern und in Küstennähe vor. Der Genus enthält einige Arten, die für den Menschen pathogen sein können. Dazu werden in erster Linie *C. botulinum* und *C. perfringens* gezählt. Daneben kennt man zahlreiche psychrotrophe, mesophile und thermophile Arten, die Ursache von Lebensmittel-Verderb sein können (BAUMGART, 1998).

Vegetative Zellen der pathogenen Arten wie *C. botulinum* bilden gefährliche Toxine, die Sporen sind besonders resistent, können normale Kochtemperaturen überleben und wachsen auch in vakuum-verpackten Lebensmitteln oder unter modifizierter Atmosphäre. Der am meisten mit dem Fisch vergesellschaftete Typ von *C. botulinum* ist der Typ E. Seine Sporen sind im Bodenschlamm von Süß- und Salzwasser weit verbreitet und kommen im Magen-Darm-Kanal von Fischen vor (HYTTIÄ et al., 1998). Daher ist eine Kontamination des Fisches in seinem natürlichen Lebensraum durch Kontakt mit Sediment oder durch seinen Kot leicht möglich. Durch sofortiges Ausnehmen des Fisches nach dem Fang kann ein großer Teil der Keimbelastung entfernt werden (BGVV, 2000). Die Kontaminationsrate kann verringert werden, wenn die Fische vor der Schlachtung einige Tage genüchert werden und das Wasser des Hälterungsbeckens regelmäßig von Abfall befreit wird (CANN et al., 1975).

Die Art *Clostridium botulinum* wird aufgrund seiner Toxinbildung zur Zeit in die Typen A bis G unterschieden. Es gibt proteolytische und nicht proteolytische Stämme. Die Proteolyten bilden die Toxine A, B und F, die Nicht-Proteolyten die Toxine B, E und F. Bei den proteolytischen hitzestabilen Stämmen erfolgt die Toxinbildung unter optimalen Bedingungen erst ab 10°C; den Verderb erkennt man dabei sensorisch durch die Bildung zahlreicher wahrnehmbarer Fäulnisprodukte wie H<sub>2</sub>S und NH<sub>3</sub> (KRÄMER, 1997). Gefährlicher sind die nicht proteolytischen, hitzeempfindlichen Stämme, die Toxine schon ab 3,3°C bilden und sich auch bei niedrigeren Temperaturen vermehren können (SPERBER, 1982; EKLUND, 1982). Sie erzeugen nur geringe Verderbniserscheinungen und werden daher nur schlecht erkannt. Vor allem in verpackten Lebensmitteln wie Frischfisch in modifizierter Atmosphäre (MA) kommt es zu der Unterdrückung der aeroben Verderbnisflora zugunsten der sich anaerob ungehindert vermehrenden nicht-proteolytischen Clostridien (CONNER et al., 1989; REDDY et al., 1997). Für den Menschen bedrohlich sind nur die von den *C. botulinum*-Typen A, B, E und F gebildeten Toxine. Sie zählen zu den stärksten bekannten Giften, für das Toxin A wird eine letale Dosis für den Menschen bei oraler Aufnahme von 0,1 bis 1,0 µg geschätzt (KRÄMER, 1997). Nach Fischgenuss aufgetretene Botulismuserkrankungen wurden fast ausschließlich durch den nicht-proteolytischen Stamm des Typ E ausgelöst, dessen Neurotoxin beim Menschen zentral-nervöse Symptome, Durchfälle und Erbrechen erzeugt (BACH et al., 1971; SCHULZE, 1986).

Die Kontamination von Lebensmitteln ist recht häufig und kann vor allem während der Zubereitung und Verarbeitung des Lebensmittels erfolgen. In der jüngsten Zeit wurde weltweit im Durchschnitt jährlich von etwa 450 *C. botulinum* - Ausbrüchen berichtet, davon wurden 12 % durch den Typ E ausgelöst (HATHEWAY, 1995). In Fischprodukten wiesen z.B. HYYTIÄ et al. (1998) bei Untersuchungen mit Gensonden bei 10 bis 40 % der Proben *C. botulinum* nach. Im Lebensmittel ist entscheidend, ob die gegebenen Bedingungen die Vermehrung des Erregers und seine Toxinbildung begünstigen. Durch gängige Konservierungsverfahren bei der Herstellung von Fischkonserven können Sporen (80°C, 15 min), bzw. hitzelabile Toxine (80°C, 6 min) zerstört werden (FELDHUSEN, 2000). Bei unsachgemäßen Konservierungsprozessen können hitzeresistente Sporen auskeimen und vegetative Zellen und Toxine bilden. Ein weiteres Risiko geht von vakuum-verpacktem heißgeräucherten Fisch aus, da unzureichendes Erhitzen beim Räucherungsprozess den Erreger und die Sporen nicht abtötet und Keime sich in einer anaeroben Atmosphäre leicht vermehren

können, während die aerobe Begleitflora reduziert wird und keine Konkurrenz mehr für Clostridien darstellt. KORKEALA et al. (1998) berichten von zwei Erkrankungen in Deutschland durch den Verzehr von in Finnland geräucherten kanadischen Maränen. Erkrankungen durch Fischverzehr wurden bisher vor allem durch Räucherfische sowie mildgesalzene, unzureichend gesäuerte oder erhitzte Produkte genannt, in allen Fällen handelte es sich aber um anaerob gelagerte Erzeugnisse. Ein Botulismusausbruch durch den Verzehr von geräucherten Forellen aus einer Forellenzuchtanlage in Deutschland (BACH et al., 1971) ließ Zweifel an der Sicherheit von Zuchtforellen aufkommen, so dass in Folge davon mehrere Untersuchungen durchgeführt wurden (WARD, 1989). In Dänemark zeigte eine Studie, dass die Häufigkeit des Clostridien-Befalls in Teichanlagen von der Jahreszeit und somit von der Temperatur abhängig ist. So wiesen in den kälteren Monaten 5-100 % der Forellen *Clostridium botulinum* auf, in den Sommermonaten dagegen waren 85-100 % der Fische aller untersuchten Fischfarmen kontaminiert (HUSS et al., 1974). In einer englischen Studie wurde in 13 von 17 Forellenfarmen *Clostridium botulinum* nachgewiesen. Bei insgesamt 1400 untersuchten Forellen betrug die Inzidenz von *Clostridium botulinum* auf Ganzfisch und in den Eingeweiden 9,4 % bzw. 11 % (CANN et al., 1975).

#### 2.3.4.6 *Listeria* spp.

Listerien kommen ubiquitär vor und konnten aus verschiedenen Umweltquellen wie Erdboden, Oberflächenwasser, Pflanzen, Tieren und menschlichen Abfällen und vor allem auch im landwirtschaftlichen Bereich isoliert werden (SEELIGER und JONES, 1986). Es handelt sich um zarte, peritrich begeißelte, bei 20°C gut bewegliche grampositive Stäbchenbakterien, die aerob kultiviert werden können. Listerien sind gegen physikalische und chemische Einflüsse relativ widerstandsfähig. Für Mensch und Tier können die Arten *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* pathogen sein, indem sie ein Hämolysin bilden, das rote Blutkörperchen auflöst. Andere Arten wie *L. innocua* und *L. seeligeri* gelten als apathogen (KRÄMER, 1997). Im Zusammenhang mit kontaminierten Lebensmitteln wie Milch und Milchprodukten, Fleischprodukten und Meerestieren wird von Epidemien berichtet. Dabei ist *L. monocytogenes* die dominierende pathogene Art, sie ist psychrotroph und vermehrt sich auch bei Kühlschranktemperaturen ab 0°C, wodurch der Erreger als besonders gefährlich gilt.

Die Keime werden mit dem Lebensmittel aufgenommen, gelangen in den Gastrointestinaltrakt und können v.a. bei Immunitätsgeschwächten oder älteren Personen, aber auch bei kleinen Kindern eine primäre Septikämie oder eine Meningoenzephalitis auslösen. Bei Schwangeren kann die Listeriose fruchtschädigend verlaufen (KAYSER, 1993). In Nordeuropa erkrankten auf 1 Million Einwohner im Jahr 3 bis 10 Personen an Listeriose, in Deutschland werden ca. 200 Listeriose-Fälle auf 80 Millionen Einwohner pro Jahr geschätzt (STEINMEYER und TERPLAN, 1990; MANGOLD, 1991; BUCHANAN et al., 1997; BGVV, 1999).

Im Zusammenhang mit Fischprodukten werden häufig *Listeria* spp. nachgewiesen. Dabei findet sich der Erreger v.a. in Gewässern mit einem hohen Gehalt an organischem Material, wie Flüssen und Küstengewässern (BEN EMBAREK, 1994). Bei einer Untersuchung von Wasserproben in Kalifornien fanden COLBURN et al. (1990) in 81 % der Süßwasserproben und in 33 % der Salzwasserproben *Listeria* spp. Bei 62 % der Isolate handelte es sich um *L. monocytogenes*, dessen Keimzahl sich nach dem Eintrag vom Süß- ins Salzwasser verringerte. Listerien gelangen hauptsächlich nach dem Fang und bei der Verarbeitung durch Kontamination auf den Fisch. In fischverarbeitenden Betrieben reichert sich der Erreger in feuchten und kühlen Bereichen an, kann auch auf Edelstahloberflächen einen Biofilm erzeugen und zählt in vielen Betrieben zur unvermeidlichen Hausflora (HERALD und ZOOTOLO, 1988; RØRVIK et al., 1995; WONG, 1998; BREMER et al., 2001; MIETTINEN et al., 2001). Für das Jahr 1997 gibt der Deutsche Zoonose-Bericht (BGVV, 1997) bei 14,8 % von insgesamt 1321 untersuchten Fischereierzeugnissen *L. monocytogenes* - positive Befunde an. Davon waren geräucherte, gefrorene, marinierte und gekochte Produkte betroffen. WEAGANT et al. (1988) fanden in 61 % von insgesamt 57 Proben gefrorener Fischprodukte und Meeresfrüchte Listerien, 26 % waren *L. monocytogenes*. Ein Vergleich von kalt- und heißgeräucherten Fischprodukten zeigte bei kaltgeräucherten Produkten mit 21,25 % eine höhere Inzidenzrate als bei heißgeräucherten mit 8,8 % (HEINITZ und JOHNSON, 1998). Eine Reihe anderer Studien belegen, dass *L. monocytogenes* sich bei 5°C in kaltgeräucherten, vakuumverpackten Fischen, anders als in heißgeräucherten Produkten, innerhalb einer Woche um 1 bis 2 Zehnerpotenzen vermehren kann (HUSS, 1997, zitiert von FELDHOUSEN, 2000). JEMMI und KEUSCH (1992) wiesen in ihrer Untersuchung nach, dass *L. monocytogenes* den Heißräucherungsprozess nicht überleben kann (Kerntemperatur 65°C, 20 min, dann



60°C, 45 Min). Sie vertreten die Ansicht, dass eine Kontamination des Produktes erst nach dem Verarbeitungsprozess erfolgt.

Nach Empfehlungen des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV, 2000) werden in der Lebensmittelüberwachung für 4 verschiedene Kategorien von Lebensmitteln Beanstandungsgrenzen festgelegt. Drei Kategorien (I, II und III) umfassen verzehrsfertige Produkte. Zur Kategorie I zählen Produkte, die für besonders gefährdete Zielgruppen (Säuglinge, Kleinstkinder, Schwangere, Immungeschwächte) vorgesehen sind, für diese wird eine Nulltoleranz gefordert. Für die Kategorien II und III gilt ein Grenzwert von 100 KbE/g, zur Kategorie IV gehören nicht verzehrsfertige Lebensmittel, die bestimmungsgemäß unmittelbar vor dem Verzehr einem Listerien abtötenden Erhitzungsverfahren unterworfen werden, und für die es keine Grenzwerte gibt. Die Codex Alimentarius Kommission empfiehlt, dass grundsätzlich die Keimzahl in allen Lebensmitteln zum Zeitpunkt des Verzehrs 100 *L. monocytogenes*/g nicht überschreiten sollte. Präventive Maßnahmen umfassen die fachgemäße, hygienisch einwandfreie Herstellung und Lagerung der Lebensmittel durch Anwendung von betrieblichen GHP- und Hygieneregeln (GHP = Gute-Hygiene-Praxis).

#### 2.3.4.7 *Enterobacteriaceae*

Zur Familie der *Enterobacteriaceae* werden gramnegative, sporenlose, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien gezählt. Sie können beweglich oder unbeweglich, pathogen oder apathogen sein. Zu den obligat pathogenen Gattungen und Arten gehören *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia pestis* und *Y. pseudotuberculosis*. Einige fakultativ pathogene Gattungen, wie *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* oder *Edwardsiella* kommen physiologisch im Darmtrakt von Mensch und Tier vor. Infolge von Umweltkontaminationen durch Warmblüterfäzes sind diese Darmbakterien ubiquitär verbreitet, so werden einige auch im Erdboden, im Wasser oder auf Pflanzen gefunden (KRÄMER, 1997). Bei Süßwasserfischen wurden *Enterobacteriaceae* in erster Linie im Darm gefunden (TORANZO et al., 1994, DE PAOLA et al. 1995, SUGITA et al., 1997). Dort sollen sie eine physiologische Rolle spielen. So ist z.B. *E. coli* in der Lage, im Darm von Fischen eine Verbindung der Gruppe der Koagulationsvitamine, Vitamin K<sub>2</sub>, zu synthetisieren, so dass hierdurch der normale Bedarf zum Teil oder völlig gedeckt werden kann (STEFFENS, 1985).

Eine große Bedeutung haben *Enterobacteriaceae* beim Verderb von Fischen. Teils wird in Fischprodukten von erhöhten Keimzahlen berichtet. Es kann bei der Verarbeitung zu Kreuzkontamination zwischen Haut und Darm und dem Filet kommen oder eine Kontamination durch das Personal erfolgen. LYHS et al. (1998) wiesen beim Verderb von vakuum-verpackten kaltgeräucherten Regenbogenforellenfilets bei 85 der insgesamt 620 isolierten Keime *Enterobacteriaceae* nach. Der Erreger wurde auch von LINDBERG et al. (1998) in 31 % von 72 Süßwasserfisch-Proben aus dem Einzelhandel gefunden. *Enterobacteriaceae* gelten als Indikatorkeime für eine mangelhafte Hygiene bei der Be- und Verarbeitung im Betrieb. Einige der Vertreter dieser Familien sind für den Menschen pathogen und können eine Vielzahl von Krankheiten hervorrufen.

Als wichtige humanpathogene Vertreter der Familie der *Enterobacteriaceae* sind die Salmonellen zu nennen. Diese sind gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchen. Der Genus besteht aus zwei Species, von denen *Salmonella enterica* klinische und epidemiologische Bedeutung besitzt. *S. enterica* wird in weitere Subspecies aufgeteilt, wobei die Subspecies *S. enterica* subsp.*enterica* etwa 2500 Serovare umfasst, die durch die Bestimmung der O- und H- Antigene unterschieden werden (BOCKEMÜHL, 1992; KRÄMER, 1997).

Salmonellen sind weltweit verbreitet und können auch im Darm von Mensch und Tier und in fäkal verschmutzten Gewässern vorkommen. In Buchten und Mündungsgewässern zeigten RHODES und KATOR (1988) eine Vermehrungs- und Überlebensdauer von Salmonellen und *Escherichia coli* von mehreren Wochen. Salmonellen wurden häufig in Fischen, Krebsen und Muscheln küstennaher Gewässer oder in Binnengewässern, in die Abwässer eingeleitet wurden, gefunden (ABO-ELNAGA, 1980; SON und FLEET, 1980; DURAN et al. 1983; SAUPE, 1989). Diese Fische gelten dann als passive Träger von *Salmonella* spp. und können den Erreger in andere Gewässer transportieren. Bei der Verarbeitung von Frischfisch können die im Magen-Darmtrakt der Fische vorkommenden Keime auf die Oberfläche der Fische und in das Muskelgewebe übertreten und zu einer sekundären Kontamination des fertigen Fischproduktes führen. Weiterhin kann eine Verwendung von Oberflächenwasser bei der Verarbeitung der Fische zu Problemen bei der Konsumware führen, insbesondere der Rohware, da einige Vertreter des Wassergeflügels zu potenten Ausscheidern von Salmonellen und anderen

Krankheitskeimen zählen. Erstmals beschrieb 1914 Müller eine Salmonellose infolge Fischverzehr (SAUPE, 1989). Nach dem Genuss von Fischerzeugnissen, besonders Räucherfischen, kam es in unterschiedlichen Abständen zu Salmonellosen (BRYAN, 1980). Eine Salmonellose äußert sich in Entzündungen der Darmschleimhaut, Fieber und Brechdurchfällen und tritt 12 bis 36 Stunden nach der Infektion auf.

Salmonellen gehören weltweit zu den häufigsten Auslösern von durch Lebensmittel ausgelösten Gastroenteritiden. Wie aus dem Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonose-Erkrankungen des BgVV (1997) hervorgeht, wurden in Deutschland in 0,66 % von 5060 untersuchten Fischereiprodukten Salmonellen nachgewiesen. Die überwiegende Zahl an Salmonellosen wird nicht durch Meerestiere, sondern durch andere tierische Erzeugnisse wie rohe Eier oder Geflügelfleisch ausgelöst. Die öffentlichen Gesundheitsorganisationen in Europa und den USA gehen davon aus, dass die Salmonellose-Gefahr durch Fischereierzeugnisse als gering anzusehen ist (REILLY, 1998).

#### 2.3.4.8 Humanpathogene Parasiten – *Anisakis simplex*

Parasitosen aus ungenügend erhitzten oder verarbeiteten Nahrungsmitteln stellen ein weltweites Gesundheitsproblem dar. Von häufigen Erkrankungen nach dem Verzehr von rohen oder schwach gegarten Fischen wird v.a. in Entwicklungsländern berichtet. Für den Menschen infektiöse Parasitenstadien finden sich in vielen Süß- und Salzwasserfischen. Mehr als 50 Helminthenarten bei Fischen und Schalentieren können beim Menschen Krankheiten verursachen. Epidemiologisch kommt aber die Mehrzahl der humanpathogenen Arten nur selten vor und verursacht nur wenige ernstzunehmende Erkrankungen. Bei einer Untersuchung an Plötzen (*Rutilus rutilus*) aus Berliner Gewässern zeigten insgesamt 64 % der Fische einen Befall mit Trematoden-Muskelmetazerkarien, von denen jedoch nur 3 Arten (*Opisthorchis felinus*, *Metorchis bilis* und *Pseudamphistomum truncatum*) als Zoonoseerreger aus lebensmittelhygienischer Sicht relevant sind (SCHUSTER et al., 2001). Neben den Cestoden und den Trematoden sind besonders Vertreter der Familie der Nematoden (Rundwürmer) häufig in Seefischen zu finden. Zu den Nematoden werden ca. 750 verschiedene Arten gezählt (MÖLLER, 1988), die Fische als End- oder als Zwischenwirte besiedeln. Sie durchlaufen 5 Entwicklungsstadien mit 4 jeweils durch Häutungen getrennten Juvenilstadien in verschiedenen kleinen Krebstieren oder in

planktonfressenden Fischen, wobei das dritte Larvenstadium für den Endwirt infektiös ist. Bei den Seefischen gehören die humanpathogenen Nematoden zur Ordnung der *Ascaroidea*, Familie *Anisakidae*. Gesichert ist die Übertragbarkeit auf den Menschen für *Anisakis* spp., insbesondere für die am häufigsten vorkommende Art *Anisakis simplex* (Walwurm, Heringswurm), und *Pseudoterranova decipiens* (Robbenwurm, Kabeljauwurm). Biochemische Untersuchungen deuten darauf hin, dass sich unter der Bezeichnung *Anisakis simplex* mehrere, genetisch getrennte Formen oder Arten verbergen (NASCETTI et al., 1986). *Anisakis* spp. haben kleine Wale wie Delphine zum Endwirt und können sich somit in allen Gewässern gleichmäßig verbreiten. Sie sind vor allem bei pelagischen, planktonfressenden Arten wie Hering, Wittling und Seelachs verbreitet. Die zweite Gattung mit der bisher einzigen bekannten Spezies *Pseudoterranova decipiens* benutzt Robben als Endwirt und ist daher eher in Fischen küstennaher Gewässer verbreitet. Der Lebenszyklus beider Arten ist ähnlich. Die warmblütigen Endwirte scheiden Eier in das Wasser aus, aus denen freischwimmende Larven schlüpfen. Diese werden von marinen Krustentierchen (*Crustaceae*) aufgenommen und entwickeln sich zu Typ 2- oder Typ 3-Larven weiter. Fische und Tintenfische, die sich von diesen Krebstierchen ernähren, dienen als Transportwirte. Auch Raubfische können von diesen Larven als weitere Zwischenwirte besiedelt werden. Erst bei Aufnahme der Larven durch die fischfressenden Endwirte erfolgt die Reifung zum geschlechtsreifen Wurm. Für *Anisakis* spp. gelten in erster Linie Leuchtgarnelen (*Euphausiacea*) als erster Zwischenwirt und Fische wie Heringe, die sich im Nordatlantik vorwiegend von diesen Tierchen ernähren, als zweiter Zwischenwirt (MÖLLER, 1988).

*Anisakis simplex* und *Pseudoterranova decipiens* sind die Erreger der Anisakose des Menschen. Dabei ist der Mensch für beide Arten ein Fehlwirt. Eine Infektion erfolgt über den Verzehr von rohen oder nur leicht konservierten Lebensmitteln, z.B. Fischinnereien wie Leber und Rogen oder auch mild-gesalzene Heringe oder kaltgeräucherte Fischprodukten. Nach dem Verzehr gelangen die präadulten *Anisakis*-Larvenstadien, in erster Linie die Larvenform L3 (SMITH, 1999), in den Magen und können sich dort in die Magen- und Darmwand einbohren. Ihre Bohrbewegungen verursachen eosinophil infiltrierte Geschwüre oder hämorrhagische Läsionen, in seltenen Fällen kann auch die Leibeshöhle des Endwirtes besiedelt werden. Die Symptome der Anisakose sind akute Magenschmerzen, Übelkeit und Erbrechen (FELDMEIER und POGGENSEE, 1991).

Diese infektiösen Larven des Stadiums III sind weiß, 15 bis 30 mm lang und etwa 1 mm dick. Sie sind in der Regel spiralig aufgerollt, mit dem vorderen Ende nach außen. Bei mikroskopischer Betrachtung weisen sie einen verdickten Ventrikel zwischen Ösophagus und Darm auf ohne blindsackartige Erweiterungen. Die Larven sind nicht in der Lage, sich im Menschen zu der adulten Form weiterzuentwickeln, so dass sie bald absterben. Akute Beschwerden können häufig innerhalb von 1 bis 2 Wochen abklingen. Eine Abtötung der Larven kann durch Erhitzen (über 55°C für 1 Minute) oder Tiefgefrieren bei -20°C für 24 Stunden (Erreichen der Kerntemperatur innerhalb von 12 Stunden) erfolgen.

Die Larven von *Pseudoterranova decipiens* sind gelblich bis rötlich braun gefärbt, länger und dicker als *Anisakis* und nicht aufgerollt. Morphologisch besitzen sie im Unterschied zu *Anisakis* einen nach vorne gerichteten Blindsack des Darmes, der am Ventrikel vorbeireicht (OLSON et al., 1983; MÖLLER, 1988). *Pseudoterranova decipiens* bohrt sich beim Menschen bevorzugt in die Magenwand ein, führt aber im allgemeinen nur zu geringen Beschwerden und ist gastroskopisch zu entfernen (MÖLLER und ANDERS, 1983).

#### Verbreitung in den Gewässern, Verteilung und Migration im Fischkörper

In salzarmen Gewässern wie weiten Teilen der Ostsee sind primäre Infektionen von Fischen nicht möglich, da die Krebstierchen als Erstwirte auf eine Mindestsalinität angewiesen sind und Wale als Endwirte fehlen (MÖLLER, 1988). Sofern aber bereits infizierte Fische in diese Gewässer ziehen, wie zum Beispiel Hering-Frühjahrs-laicher aus der Nordsee (MÜNKNER und KARL, 2000), können die Larven auch in dort heimische Raubfische wie den Zander wechseln. FEILER und WINKLER (1981) berichteten allerdings über sporadische Nematodenfunde nur bei Zandern über 60 cm Körperlänge. Es konnte gezeigt werden, dass die Befallsrate einer Fischart vom Fanggebiet beeinflusst wird. So wies KHALIL 1969 bei Heringen aus verschiedenen britischen Gewässern eine stark differierende Inzidenz von *Anisakis*-Larven zwischen 4 und 100 % auf. Auch in einer Untersuchung von KARL und LEINEMANN (1995) wurden bei Befallsraten von 84 bzw. 100 % stark unterschiedliche Befallsintensitäten zwischen Heringen aus westbritischen Gewässern und aus Nordseefängen festgestellt, wobei letztere bis zu 10fach höhere Nematodenzahlen in der Leibeshöhle aufwiesen.

Seefische aus Aquakulturen, die ausschließlich mit Fertigfutter ernährt werden, gelten allgemein als nematodenfrei (HOWGATE, 1998).

Für den Menschen sind die *Anisakis*- und *Pseudoterranova*- Larven vor allem dann gefährlich, wenn sie aus der Leibeshöhle des Fisches in die Muskulatur übertreten und den verzehrsfähigen Anteil des Fisches kontaminieren, oder wenn kontaminierte Innereien des Fisches, z.B. geräucherte Rogen, verzehrt werden. Zahlreiche Untersuchungen wiesen Larven in der Muskulatur fangfrischer Fische nach. Dabei kann eine Besiedlung der Muskulatur schon zu Lebzeiten des Fisches erfolgen (KHALIL, 1969). Bei den fangfrisch untersuchten Fischen findet sich der überwiegende Teil der Nematodenlarven in den Mesenterien der Bauchhöhle oder den Organen aufgelagert in einer dünnen bindegewebigen Kapsel. Im Falle eines Übertrittes von *Anisakis*-Larven in die Muskulatur wurden diese vor allem in der dünnen Bauchwandmuskulatur, die dem vorderen Teil der Leibeshöhle anliegt, nachgewiesen (ARTHUR et al., 1982; HERRERAS et al., 2000). So unterschieden ROEPSTORFF et al. (1993) zwischen dem Anteil im Filet, den Bauchlappen und den Eingeweiden. Die von ihnen untersuchten Heringe (*Clupea harengus*) wiesen 2-3 % der insgesamt gefundenen Larven in den Bauchlappen und 0,6 bis 1,2 % im Filet auf. Darüber hinaus gibt es von Fischart zu Fischart starke Unterschiede im Anteil an *Anisakis*-Larven in der Muskulatur. So fanden sich bei fangfrischen Makrelen (*Scomber scombrus*) 10 % der Larven im Fischfleisch, beim Blauen Wittling (*Micromesistius poutassou*) lag der Anteil bei etwa 18 % und beim Wittling (*Merlangius merlangus*) bei rund 66 % (SMITH, 1984). Für Seelachs (*Pollachius virens*) und Kabeljau (*Gadus morhua*) sind Befallsintensitäten in der Muskulatur von 0,4 % bzw. 3,2 % der Nematodengesamtzahl beschrieben, während Rotbarsch (*Sebastes marinus*) 12 % der Larven intramuskulär aufwies (STROMNES und ANDERSEN, 1998). Bei pazifischen Wildlachsen betrug der Anteil der in den essbaren Anteilen aufgefundenen *Anisakis*-Larven sogar 87 % (DEARDORFF und KENT, 1989). MÖLLER und SCHRÖDER (1987) stellten in einer Untersuchung mit verschiedenen Fischarten fest, dass *Pseudoterranova* im Vergleich zu *Anisakis* spp. noch wesentlich häufiger in der Muskulatur von Fischen zu finden ist.

Ob Larven nach dem Tode des Wirtsfisches in der Lage sind, gezielt aus den Eingeweiden in die Muskulatur zu wandern und somit zu einer signifikanten Erhöhung der Belastung essbarer Gewebeteile führen, ist umstritten.

Es wurde vor einiger Zeit die Hypothese aufgestellt, dass während der Lagerung von nicht ausgenommenen Fischen Nematoden aus der Bauchhöhle in das Filet einwandern können. Bei Fettfischen wie der Makrele konnte in einigen Studien auch noch nach der Kalträucherung eine erhöhte Anzahl von Nematodenlarven in der Muskulatur nachgewiesen werden, was diese Hypothese unterstützen würde (HAUCK, 1977; SMITH, 1984). Auf der Basis solcher Ergebnisse wurde in § 4 der Fischhygiene-Verordnung das sofortige Ausnehmen vorgesehen. Publierte Untersuchungen an unausgenommen und ausgenommen gelagerten Magerfischen jedoch belegten in keinem Fall eine Erhöhung der Larvenzahlen in der Muskulatur bei unausgenommen gelagerten Fischen. Es ergaben sich keine Anzeichen auf eine Wanderung von *Anisakis*-Larven aus den Eingeweiden in die umgebende Muskulatur, so dass bei Nematodenfunden in der Muskulatur von einem Übertritt der Larven schon vor dem Tod des Fisches ausgegangen wird (ARTHUR et al., 1982; HUSS und DREWES, 1989; ROEPSTORFF, et al., 1993; HERRERAS et al., 2000). Nach diesen Ergebnissen stellt ein unverzügliches Ausnehmen der Fische nach dem Fang in bezug auf die Nematoden keine risikomindernde Maßnahme dar.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Art und Herkunft, Fang und Schlachtung der Fische

Zur Feststellung des Hygienestatus und der Frischebeurteilung ausgenommener und unausgenommener Süßwasserfische wurden als Modellfische Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und Zander (*Sander lucioperca*) gewählt. Die Regenbogenforellen stammten aus einer brandenburgischen Forellenwirtschaft. Bei den Zandern handelte es sich nicht um ausschließlich im Süßwasser lebende Tiere, sondern um Fische aus Boddengewässern. Als Bodden bezeichnet eine seichte, unregelmäßig geformte Bucht mit enger Öffnung zum Meer, die durch Überflutung entstanden und typisch für die Ostseeküste Mecklenburg-Vorpommerns ist. Das Wasser des Boddens ist schwach salzhaltiges Mischwasser aus Süß- und Salzwasser (Brackwasser).

##### 3.1.1.1 Zander

Zwischen November 2000 und April 2001 wurden insgesamt 5 Gruppen von Ostsee-Zandern aus jeweils einem Fang untersucht (siehe Tabelle 8). Die Fische der Gruppen 1, 2, 3 und 5 stammten aus dem Achterwasser und den Boddengewässern rings um Usedom und wurden von verschiedenen Booten nach der Anlandung zentral im Fischgroßhandel Birnbaum & Kruse in Lassan gesammelt. Zander der Gruppe 4 wurden nach einem schweren Oststurm im Boddengewässer bei Ribnitz-Damgarten gefangen, waren aber für diese Region untypisch groß, so dass vermutet werden kann, dass es sich um Fische des Freiwassers handelte, die in den Bodden gedrückt wurden.

Die Gruppen 1 und 2 dienten als Vorversuchsfische. An ihnen sollten mikrobiologische Techniken erprobt, zu erwartende Keimzahlen festgestellt sowie die Sensorik mit Frischegrad (FG)- und Sensorikbewertung entwickelt werden. An der Gruppe 3 vom Januar 2001 wurde im Hauptversuch der mikrobiologische Verderb und die Entwicklung von TVB-N untersucht. Die Gruppen 4 und 5 wurden für die Hauptversuche der Sensorik-Prüfung (Frischegrad und Kochprobe) auf Unterschiede



zwischen ausgenommenen und nicht ausgenommen gelagerten Fischen herangezogen. Von allen 5 Gruppen wurden die Eingeweide sowie Bauchlappen- und zum Teil Rückenmuskulatur auf das Vorkommen von Nematodenlarven geprüft.

Tabelle 8: Eigenschaften der fünf untersuchten Zandergruppen

Gruppe	Fangdatum	Untersuchung	leer / rund	Fischzahl	Länge [cm]	Fanggewicht [g]	Schlachtgewicht [g]	Schlachtverlust %	Geschlecht		
									w	m	u
1	06.11.00	Vorversuch Mikrobiologie+ FG/Sensorik	leer	16	47 +/- 5	1118 +/- 368	1029 +/- 332	8	4	4	8
			rund	29	48 +/- 5	1278 +/- 417	1169 +/- 332	9	3	6	20
2	06.12.00	Vorversuch Mikrobiologie+ FG/Sensorik	leer	14	52 +/- 2	n.b.	1566 +/- 208		5	2	7
			rund	20	54 +/- 3	1746 +/- 244	1537 +/- 180	12	11	5	4
3	15.01.01	Hauptversuch Mikrobiologie	leer	25	53 +/- 3	1831 +/- 269	1624 +/- 215	11	14	7	4
			rund	30	53 +/- 3	1754 +/- 194	1522 +/- 168	13	14	16	0
4	23.03.01	Hauptversuch FG/Sensorik	leer	9	65 +/- 3	3057 +/- 549	2651 +/- 462	13	5	4	
			rund	12	63 +/- 4	2935 +/- 548	2525 +/- 548	14	7	5	
5	02.04.01	Hauptversuch FG/Sensorik	leer	20	57 +/- 5	n.b.	1714 +/- 459		n.b.		
			rund	20	58 +/- 5	2230 +/- 621	1918 +/- 519	14	11	9	

Gewicht und Länge: arithmetisches Mittel und Standardabweichung

Schlachtverlust: Eingeweidegewicht bezogen auf Fanggewicht

FG = Frischegrad; w = weiblich, m = männlich, u = unbestimmbar, n.b.: nicht bestimmt,

leer = ausgenommen, rund = nicht ausgenommen

Sie wurden nicht unmittelbar nach der Anlandung ausgenommen, sondern gelangten unter Eis gelagert als Vollfische in das Institut, wo sie spätestens 24 Stunden nach dem Fang ausgenommen wurden.

Der Fütterungszustand der Fische war von Gruppe zu Gruppe unterschiedlich. Die Fische der Vorversuchsgruppen wiesen mehrheitlich einen leeren Magen und Darm auf. Die Fische der vierten und fünften Gruppe zeigten fast alle einen gefüllten Magen, während der Darm meist leer war. Das Fanggewicht lag im Schnitt bei

1660 g, die Fische der Gruppe 4 waren mit ca. 3000 g wesentlich schwerer als Fische der anderen Gruppen. Der Schlachtverlust lag bei 8 bis 14 Prozent.

### 3.1.1.2 Regenbogenforellen

An den Regenbogenforellen wurden bakteriologische und sensorische Untersuchungen in verschiedenen Zeiträumen des Forschungsprojektes durchgeführt. Dabei stammten die Versuchsfische zum Teil aus einer Forellenwirtschaft mit einer Rinnenanlage in Treuenbrietzen in Brandenburg (Forellenwirtschaft Steinmühle der GBR Binnenfischerei Potsdam), zum Teil aus der Kreislaufanlage (KA) des Versuchsgutes des BgVV. Fangdatum, Untersuchungsart, Gewichte der Fische und weitere Einzelheiten sind in der Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: Eigenschaften der untersuchten Regenbogenforellengruppen

Untersuchung	Fangdatum	Untersuchung	Anzahl Versuchsdurchgänge	Herkunft	ausgenommen amk rund vmk	Fischzahl	Länge [cm]	Fanggewicht [g]	Schlachtgewicht [g]	Schlachtverlust %
I	09.-12. 1999	Mikrobiologie von und Haut Filetmuskel, Frischegrad	4	FA	amk	132	30	ca. 378		
					vmk	132				
II	09.-11. 2000	Frischegrad und Sensorik	3	KA	amk	45	25	248 +/- 40	228 +/- 38	8 %
					vmk	45				
II	06.-08. 2001	Mikrobiologie von Bauchlappen und Darm	3	FA	amk	85	30	385 +/- 44	336 +/- 37	13 %
					vmk	145				

Gewicht und Länge: arithmetisches Mittel und Standardabweichung:

Schlachtverlust: Eingeweidegewicht bezogen auf Fanggewicht; leeres Feld: nicht gemessen; FA =Forellenanlage, KA =Kreislaufanlage des Institutes

Die Tiere für die Untersuchungen im Winter 1999 und für die bakteriologischen Untersuchungen im Sommer 2001 kamen aus der Forellenanlage in Brandenburg. Die Anlage verfügt über Betonrinnen, in denen die Fische nach Alter sortiert gehalten werden. Die Rinnen werden mit Oberflächenwasser gespeist und ständig im offenen

Kreislauf durch die Rezirkulation des Wassers belüftet. Die Fütterung der Fische mit handelsüblichem Pelletfutter wurde je nach Versuchsanforderung ca. 3 bis 7 Tage vor dem Schlachten eingestellt, um die Fische zum Zeitpunkt der Schlachtung vollkommen nüchtern zu haben. Zum Teil erhielten sie noch bis 24 Stunden vor der Schlachtung Futter. Ein Teil der Versuchsfische lagerte in Eis als Vollfisch, der andere Teil als ausgenommener Frischfisch. In diesem Falle wurden Eingeweide und Niere der Fische vollständig entfernt. Die Schlachtkörper wurden nach dem Ausnehmen im Institut gewaschen.

Die Untersuchungen im Winter 1999 erfolgten in 4 Durchgängen. Insgesamt kamen 264 Regenbogenforellen, 132 ausgenommene und 132 nicht ausgenommene, für die bakteriologische und die Frischegrad-Untersuchung zum Einsatz. Dabei wurden 120 Forellen für die mikrobiologischen Untersuchungen, 144 für die Frischegraduntersuchung verwendet. Sie besaßen ein Körpergewicht zwischen 310 g und 525 g ( $\bar{x}$  = 378 g).

Die „Winterforellen“ im ersten Zeitraum der Untersuchung waren vor Ort in der Zuchtanlage mit zwei verschiedenen, zur Zeit für Salmoniden zulässigen Betäubungsverfahren (Kopfschlag und CO<sub>2</sub>-Betäubung) in einen Zustand der Empfindungslosigkeit versetzt und unmittelbar danach durch einen Schnitt ins Herz und vollständiger Entblutung oder durch Ausnehmen getötet worden. Im Folgenden werden unter "leer" ausgenommene und unter "voll" bzw. "rund" nicht ausgenommene Fische verstanden. Die Temperatur des Teichwassers wurde zu allen Zeitpunkten gemessen und war aufgrund der unterschiedlichen Witterungsverhältnisse im Winter um wenige Grad Celsius (+ 5°C bis + 9,5°C) verschieden.

Die Regenbogenforellen für die Sensorik-Untersuchungen im Herbst 2000 ("Herbstforellen") stammten aus der Kreislaufanlage des Institutes. Insgesamt wurden 90 Fische 7 Tage vor der Schlachtung in ein Durchflussbecken (ca. 13°C Wassertemperatur) umgesetzt. Bei einem Teil der Untersuchungsfische wurde die Fütterung zu diesem Zeitpunkt eingestellt (genüchtert), die restlichen Tiere erhielten bis 24 Stunden vor der Schlachtung noch Futter (gefüttert). Die Betäubung erfolgte durch Kopfschlag, die Tötung durch einen Schnitt hinter dem Kiemenbogen und

Ausbluten (beidseitige Durchtrennung der Vena cardinalis anterior) bzw. durch das unmittelbare Ausnehmen der Fische nach der Betäubung.

Die Regenbogenforellen für die bakteriologische Untersuchung im Sommer 2001 („Sommerforellen“) stammten ebenfalls aus dem erwähnten Zuchtbetrieb in Brandenburg. Zur bakteriologischen Beurteilung der Bauchhöhle fanden 3 Durchgänge statt. Insgesamt wurden 230 Fische zu diesem Zweck untersucht. Ein Teil dieser Fische wurde nach dem Betäuben durch Kopfschlag und dem Entbluten durch Kiemenschnitt nicht vor Ort in der Anlage sondern erst im Institut ausgenommen und unter Leitungswasser gewaschen. Diese Fische dienten für Untersuchungen zur Beurteilung der Schlachthygiene. Die Temperatur des Anlagenwassers betrug im Sommer 2001 zum Zeitpunkt der Untersuchungen ca. + 14°C.

### **3.1.2 Medien für bakteriologische Untersuchungen**

Für die bakteriologischen Untersuchungen kamen nichtselektive und selektive Nährmedien und Verdünnungsmedien sowie im Anschluss an die Kultivierung Medien für biochemische Differenzierungsreaktionen der Gattungs- und Speziesdifferenzierung zum Einsatz. Die Tabellen 3 und 4 zeigen die Medien in der Übersicht. Die vollständigen Rezepturen finden sich im Anhang.

Folgende Reagenzien wurden für biochemische Bestätigungsreaktionen verwendet:

- 3 % ige Wasserstoffperoxid-Lösung für die Katalase-Reaktion
- Medien für die Gramfärbung
- Oxidaseteströhrchen der Firma Merck (Bactident® Oxidase, Nr. 1-13300)
- Voges Proskauer- Reagenzien: 40 %ige KOH und 5 %iges  $\alpha$  -Naphthol in absolutem Ethanol
- API 20E-Testsystem, bioMerieux
- O-129 Vibriostatikum (2,4-Diamino-6,7-diisopropyl-pteridin-Phosphat) Resistenz-Blättchentest mit 10 bzw. 150  $\mu$ g (Fa. OXOID DD12, DD15)

Tabelle 10: Verwendungszweck und Nährmedien zum Mikroorganismennachweis

Verwendungszweck/Erreger	Nährmedium
	Nichtselektives Nährmedium
<b>Verdünnungsmedien</b>	<b>0,1 % Peptonkochsalzlösung</b> <b>0,1 % Peptonkochsalzlösung +0,75 %-Agar</b> , abgefüllt in Verdünnungsröhrchen <b>0,1 % Peptonkochsalzlösung +0,75 %-Agar + 1 % NaCl</b> , abgefüllt in Verdünnungsröhrchen
<b>Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl</b>	<b>PC-Agar</b> (OXOID CM 325): Plate Count Agar
	Nährmedien mit Selektiveigenschaften
<b>Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl und Shewanellen</b>	<b>Standard-I-Eisen-III-Citrat-Agar</b> mit Natriumthiosulfatzusatz für SSO (specific spoilage organism als sulfitreduzierende Shewanellen definiert) bei Zandergewebe
<b>Pseudomonaden</b>	<b>GSP-Agar</b> (MERCK 1.10230): Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar, Pseudomonaden-Aeromonaden-Selektivagar nach Kielwein
<b>Vibrionen</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Voranreicherung</li><li>• Selektive Anreicherung</li><li>• Selektivagar</li></ul>	<b>Alkalisches Peptonwasser</b> + 2 % NaCl <b>Galle-Pepton-Bouillon</b> zur selektiven Anreicherung <b>TCBS-Cholera-Agar</b> (OXOID CM 333) Thiosulfate citrate bile salt nach Nakanishi (1962), modifiziert von Kobayashi et al. (1963),
<b>Aeromonaden</b>	<b>Ryan-Agar</b> (OXOID CM 833) <b>Blutagar Nr.2</b> (OXOID CM 271) zur weiteren Ausdifferenzierung
<b>Enterobacteriaceae</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Selektivagar</li><li>• Anreicherung für MPN nur bei Zandergewebe</li></ul>	<b>VRBG-Agar</b> (MERCK 10275): Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar nach Mossel <b>gepufferter Brillantgrün-Gallesalz-Lactose-Lösung</b> (OXOID CM 31) zur Anreicherung im MPN-verfahren
<b>Clostridien</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Anreicherung nur bei Zandergewebe</li><li>• Selektivagar</li></ul>	<b>Hirn-Herz-Glucose-Bouillon</b> (BHI-Bouillon) (OXOID CM 225) mit Eisensulfid bei Zanderdarmgewebe <b>SCA-Agar</b> (OXOID CM 587): Sulfid-Cycloserin-Azid-Agar bei Forellen
<b>Listeria monocytogenes</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Selektive Anreicherung</li><li>• Selektivagar zur Identifizierung</li></ul>	<b>Fraser-Listeria-Selektiv-Anreicherungsbouillon</b> (MERCK 1.10398) <b>Fraser-Listeria-Supplement</b> (MERCK 1.10399) <b>Oxford-Agar</b> (MERCK 1.07004) <b>Palcam-Agar</b> (MERCK 1.11755)
<b>Salmonellen</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Voranreicherung</li><li>• Selektive Anreicherung</li><li>• Selektivagar zur Identifizierung</li></ul>	<b>1 % gepuffertes Peptonwasser</b> <b>Rappaport Vassiliades (RV)-Anreicherungslösung</b> (OXOID CM 669) Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Medium <b>BPLS</b> (MERCK 1.07237): Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar <b>XLD</b> (MERCK 1.05287): Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar

Tabelle 11: Verwendungszweck und Nährmedien für biochemische Tests der Gattungs- und Speziesdifferenzierung

Verwendungszweck/Erreger	Nährmedien
<b>Listerien</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Anreicherung von <i>Listeria</i> spp.</li> <li>Identifizierung von <i>Listeria</i> spp.</li> <li>Hämolysetest und CAMP-Test</li> <li>Prüfung der Beweglichkeit</li> <li>Kohlenhydratabbau</li> </ul>	<b>TSYEB:</b> Trypton-Soja-Hefe-Extrakt-Bouillon, <i>Listeria</i> -Anreicherungsmedium Basis, (OXOID CM 862) und <i>Listeria</i> -Anreicherungs-Selektiv-Supplement (OXOID SR 141) <b>TSYEA:</b> Trypton-Soja-Hefe-Extrakt-Agar, TSYEB plus Agar <b>Blutagar Nr.2</b> (OXOID CM 271) <b>Beweglichkeitsmedium</b> <b>Kohlenhydratbouillon</b> (Xylose und Rhamnose)
<b>Clostridien</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Kultivierung von Clostridien</li> </ul>	<b>Blutagar Nr.2</b> (OXOID CM 271)
<b>Aeromonaden</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Kultivierung von Aeromonaden</li> <li>Gattungsdifferenzierung <ul style="list-style-type: none"> <li>Oxidation/Fermentation von Kohlenhydraten</li> <li>Oxidation von Mannit und Inositol, Ornithin- decarboxylaseaktivität</li> </ul> </li> <li>Speziesdifferenzierung <ul style="list-style-type: none"> <li>Äskulinhydrolyse</li> <li>Gas aus Glucose, Salicinfermentation und L-Arabinoseabbau</li> <li>Lysin-Decarboxylaseaktivität</li> </ul> </li> </ul>	<b>Blutagar Nr.2</b> (OXOID CM 271)  <b>O/F-Agar-Basis</b> mit Glucose (OXOID CM 883) <b>AHM:</b> <i>Aeromonas-hydrophila</i> -Medium  <b>Äskulinbouillon</b> <b>Hottinger-Bouillon</b>  Ornithindecaboxylase- Arginindihydrolase-Testbouillon (Basis) (MERCK 1.06934) mit Lysinzusatz
<b>Vibrionen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Kultivierung der Vibrionen</li> <li>Oxidation/Fermentation von Kohlenhydraten</li> <li>Eisen-2-Zuckertest (Glucose-Lactosefermentation)</li> <li>ONPG, <math>\beta</math>-Galactosidase-Aktivität</li> <li>Wachstum in Peptonwasser unterschiedlicher Salzkonzentration</li> <li>Arginin-Dihydrogenase-Aktivität</li> <li>Ornithin-Decarboxylaseaktivität</li> <li>Lysin-Decarboxylaseaktivität</li> </ul>	<b>Columbia-Agar-Basis</b> (OXOID CM 331) und <b>Blutagar Nr.2</b> (OXOID CM 271) <b>O/F-Agar-Basis</b> mit Glucose (OXOID CM 883)  <b>Kligler-Eisen-Nährboden</b> (OXOID CM 33)  <b>ONPG-Scheiben</b> (OXOID DD 13) 1 %-iges Peptonwasser mit 0 %, 1 %, 3 %, 6 %, 8 %, 10 % NaCl Ornithindecaboxylase- Arginindihydrolase-Testbouillon (Basis) (MERCK 1.06934) mit Argininzusatz (MERCK 1.01543.0050 mit Ornithinzusatz (MERCK 1.06906.0025)  Ornithindecaboxylase- Arginindihydrolase-Testbouillon (Basis) (MERCK 1.06934) mit Lysinzusatz

### 3.1.3 Reagenzien für die Untersuchung auf Nematoden

Zur Herstellung der Pepsinlösung wurde in einem 10 l PE-Kanister 62,5 ml 32 %-ige HCl-Lösung (MERCK 1.00313) mit 50 g Pepsin vermischt und mit lauwarmen Wasser auf 10 Liter aufgefüllt.

### 3.1.4 Reagenzien für die Untersuchung auf TVB-N (Methode L 10.00-3, §35 LMBG)

( $c$  = Stoffmengenkonzentration,  $\varphi$  = Massenkonzentration,  $\sigma$  = Volumenkonzentration)

- Perchlorsäure-Maßlösung,  $c = 0,6 \text{ mol/l}$ .
- Zur Herstellung 6 %-iger  $\text{HClO}_4$  (Perchlorsäure) wurden 65 ml einer 60 %-igen  $\text{HClO}_4$  (MERCK 1.00518) auf 1 Liter Wasser aufgefüllt.
- Natriumhydroxid-Lösung,  $\varphi = 20 \text{ g/100 ml}$
- Salzsäure-Maßlösung,  $c = 0,1 \text{ mol/l}$
- Borsäure-Lösung,  $\varphi = 3 \text{ g/1000 ml}$
- Silikon-Entschäumer
- Phenolphthalein-Lösung,  $\varphi = 1 \text{ g/100 ml Ethanol}$ ,  $\sigma = \text{etwa } 96 \%$
- Indikatorlösung (Tashiro-Mischindikator)
- 2 g Methylrot und 1 g Methylenblau werden in 1000 ml Ethanol,  $\sigma = \text{etwa } 96 \%$  gelöst.

### 3.1.5 Teststämme als Kontrollstämme

Folgende Kontrollstämme wurden bei der bakteriologischen Untersuchung der Fische eingesetzt:

*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Aeromonas caviae* (Feldstamm)

*Staphylococcus aureus* DSMZ 1104 für die Durchführung des CAMP-Tests

*Rhodococcus equi* (Feldstamm) für die Durchführung des CAMP-Tests

*Listeria monocytogenes* (Feldstamm), *Listeria innocua* (Feldstamm), *Listeria ivanovii* (Feldstamm)

*Enterobacter* L8 (Feldstamm)

*Clostridium perfringens* ATCC 13124

*Pseudomonas fluorescens* (Feldstamm)

*Vibrio parahaemolyticus* DSMZ 10027 (=ATCC 17802), *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749, *Vibrio vulnificus* DSMZ 10143 (=ATCC 27562)

### **3.1.6 Geräte, Instrumente, Zubehör bakteriologische und sensorische Untersuchungen**

Scherbeneisautomat (Fa. Maja) und Temperaturschreiber (Fa. Philipps)

80 x 55 x 45 cm isolierbare Transportkiste zum Transport der Fische ins Institut

55 x 30 x 25 cm Kunststoffkisten mit Abfluss zur Aufbewahrung der Fische in Eis

55 x 20 x 15 cm Styroporkisten mit Abfluss zur Aufbewahrung der Fische in Eis

Walkgerät zum Homogenisieren von Proben (Stomacher 400 der Fa. Seward)

Sterile Stomacherbeutel (Fa. Bagpage<sup>®</sup>)

Brutschränke, eingestellt auf + 25°C, + 30°C, + 37°C, + 44°C (Fa. Heraeus)

Kühlschränke (+ 7°C, + 2°C, - 20°C)

Reagenzglasschüttler (Fa. Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik)

Bunsenbrenner mit automatischer Zündung (Fireboy der Fa. Tec No Mara)

Einwiegewaage (Fa. Sartorius)

Grobzerkleinerungsgerät (für TVB-N-Bestimmung), Ultra-Turrax (für TVB-N-Bestimmung)

UV-Lichtgerät (für Nematodenuntersuchung)

Mikroskop Axioskop (Fa. Zeiss), Plattenmikroskop (Fa. Zeiss) und weiße Lichtquelle

Folienschweißgerät (Fa. Werner Bonk, Bochum)

Anaerobiertöpfe, sterile 250 ml-Erlenmeyerkolben, Petrischalen, Reagenzgläser, 100 ml-Messkolben

Kunststoffbeutel aus sterilisierfestem Material zur Kochprobe (Kobusch Folien GmbH, Warburg)

Skalpelle, Schere, Pinzetten, Graduierte Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml), Impfösen, Impfnadeln; Schablone für die Entnahme von Haut- und Muskelproben, 2 x 5 cm

250 ml verschließbare Kunststoffflaschen aus HDPE, (Fa. Nalge Nunc International, No. 2114-0008).



## **3.2 Methodik**

### **3.2.1 Transport und Lagerungsbedingungen der Fische**

#### **3.2.1.1 Ostseezander**

Nach dem Anlanden wurden die Zander innerhalb einer Stunde in eisgefüllte temperaturisolierte Transportkisten verpackt und vom Fischgroßhandel ins Institut nach Berlin transportiert. Am Morgen nach dem Fang (entsprechend der 24-Stundenregelung bei Tagesfängen in § 4 FischHV) wurden den als ausgenommen bezeichneten Tieren die Bauchhöhlenorgane und das Nierengewebe entfernt und die Fische innen und außen mit Trinkwasser abgespült. Die rund zu lagernden Fische blieben ungewaschen. Die Eingeweide der ausgenommenen Fische wurden im Anschluß an das Ausnehmen für die parasitologische Untersuchung verwendet. Die Lagerung der Fische über ca. 14 Tage erfolgte, nach Gruppen getrennt, in mit Eis gefüllten, übereinander gestapelten Styroporkisten mit Wasserablauf bei + 2°C im Kühlraum der Fleischtechnologie des BgVV. Dabei waren die Fische vollständig mit Eis bedeckt. Bei Bedarf wurde geschmolzenes Eis ersetzt.

#### **3.2.1.2 Regenbogenforellen**

Der Transport der runden und z.T. vor Ort ausgenommenen Fische von der Rinnenanlage zum Institut erfolgte in mit Scherbeneis gefüllten isolierbaren Transportkisten mit einem Eis-zu-Fisch-Verhältnis von 1:1. Ohne Unterbrechung der Kühlkette wurden die Fische nach ihrer Ankunft im Institut in Styroporkisten umgepackt, vollständig mit Eis bedeckt und in einem Eis-zu-Fisch-Verhältnis von 1:1 unter schmelzendem Eis gelagert. Der Temperaturverlauf im Kühlraum der Fleischtechnologie und des Fischfleisches wurde mittels eines Temperaturschreibers kontinuierlich erfasst. Die Raumtemperatur betrug + 2°C, die Temperatur im Fischmuskel + 0,2-0,9°C.

### **3.2.2 Sensorische Untersuchungen durch Frischegrad-Bestimmung und Kochprobe**

#### **3.2.2.1 Überblick**

Das EU-Qualitätsklassifizierungsschema für Seefische nach der EG-Verordnung Nr.2406/96 über gemeinsame Vermarktungsnormen für Fischereierzeugnisse, (Stand: Februar 1997), Anhang I, A. Magerfische (siehe Literaturübersicht) lässt sich nicht ohne weiteres auf jede Fischart, insbesondere nicht auf die Süßwasserfische anwenden. In Anlehnung an dieses Schema wurden für eisgelagerte Regenbogenforellen und Zander Kriterien für äußere und innere Merkmale gesammelt und bewertet. Anhand der Einzelkriterien wurde dann ein Gesamteindruck gebildet, und die Fische wurden in Qualitätsklassen von E wie "Extra" bis C "verdorben" eingestuft. Die Klasse BC galt als Grenze der Verkehrsfähigkeit. Zur weiteren rechnerischen und graphischen Gestaltung und Interpretation der Ergebnisse wurden die Klasseneinteilungen in eine Punktbewertung von 9 bis 4 übersetzt. Unterhalb von 4 Punkten galt der Fisch als verdorben.

Bei jeder Fischart gingen den Hauptversuchen mehrere Vorversuche voran, in denen die unterschiedlichen Kriterien entwickelt und festgelegt und das Prüfpersonal geschult wurde. Ebenso wurde beim Kochprobenschema vorgegangen. Nach einigen Durchgängen, in denen die Prüfer Begriffe für Geschmack, Geruch, Textur und Aussehen der Fischfilets sammelten und definierten, wurden die Schemata für den Kochprobenvergleich in den Hauptversuchen herangezogen. Die Entwicklung des Schemas erfolgte in Anlehnung an ein für Kabeljau bereits bestehendes Verfahren in der Bundesforschungsanstalt für Fischerei in Hamburg.

#### **3.2.2.2 Frischegrad-Bestimmung und Kochprobe bei Regenbogenforellen**

Frischegrad: In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass das für Seefische vorhandene Schema für Regenbogenforellen modifiziert werden muss, da sich Süßwasserfische in einigen Punkten von Seefischen aufgrund der Lebensumstände wie Wassertemperaturen oder -beschaffenheit, des Nahrungsangebotes und der Körperzusammensetzung unterscheiden. In Vorversuchen wurden von einem Team

von 5-10 Prüfern Begriffe zu den einzelnen äußerlichen Merkmalen von Regenbogenforellen, wie der Beschaffenheit der Haut, Augen und Kiemen, dem Geruch der Kiemen und der Farbe und Konsistenz des Fleisches sowie zu den inneren Merkmalen, wie der Färbung der Bauchhöhle, der Festigkeit des Peritoneums und dem Geruch der offenen Bauchhöhle, definiert und gesammelt. Nach der Begriffssammlung wurden die Beschreibungen in eine zeitliche Abfolge gebracht und mit einer Klassen- bzw. Punktbewertung versehen. Die Begriffsbestimmung reichte z.B. bei der Beschreibung von Kiemenfarbe, -schleim und -form von rot, ohne Schleim, glatte Kontur über blass, viel Schleim, fransige Kontur bis hin zu braun, dicker Schleim und sehr fransige Kontur.

Bei den Regenbogenforellen wurden folgende Unterschiede zu den Seewasserrischen beschrieben, die sich in den Voruntersuchungen als Bewertungskriterien durchsetzten und in den Hauptversuchen zur Anwendung kamen:

Die Entwicklung der Hautfarbe während der Lagerung ist bei Regenbogenforellen kein eindeutiges Kriterium für den Frischeverlust. Entscheidender ist die Veränderung der Schleimbeschaffenheit auf der Haut. Das Peritoneum bei Seefischen ist dunkel und fest und lässt sich im Laufe der Lagerung zunehmend leichter mechanisch abreiben. Bei Regenbogenforellen ist es sehr dünn und durchsichtig und verliert im Laufe der Zeit an Festigkeit. Zur Prüfung der Festigkeit des Peritoneums werden die Seiten der Bauchwände gebogen, das Peritoneum zerreißt und die Gräten springen hervor. Bei Forellen stellt die Verfärbung der Bauchhöhle entlang der Mittelgräte ein gutes Frischegradkriterium dar. Kurz nach der Schlachtung und in den Tagen danach ist die Muskulatur entlang der Mittelgräte hell und glänzend, später wird sie dunkler und bräunlicher. Diese Entwicklung verläuft kontinuierlich, ist gut erkennbar und zeitlich einordbar.

Das Muskelfleisch von Regenbogenforellen wird während der Lagerung nicht so matt und stumpf wie das der Seefische. Veränderungen im Zuge der Lagerung sind kaum erkennbar. Abweichungen in der Farbe der Muskulatur können auch geschlechts-, alters- und fütterungsabhängig sein. Hier werden Veränderungen nur taktil (d.h. durch Druck spürbare Veränderungen der Muskulaturkonsistenz) wahrgenommen. Ein weiterer entscheidender Unterschied zu den Seefischen ist die Entwicklung des Geruches von Kiemen und Bauchhöhle. Regenbogenforellen können beim Verderb fruchtig und süß riechen. Ölige und schimmelige Gerüche sowie der durch  $\text{NH}_3$  und

TMA hervorgerufene fischige Geruch bei Seefischen können bei Regenbogenforellen nicht festgestellt werden. Insbesondere bei den runden Fischen stellen spezifische Geruchsentwicklungen ein wichtiges Frischekriterium dar. Tabelle 12 zeigt das fertige modifizierte Schema für die Klasseneinteilung bei der Frischegradbestimmung von Regenbogenforellen.

Tabelle 12: Modifiziertes Schema für die Bestimmung des Frischegrades von Regenbogenforellen in Anlehnung an das EU-Qualitätsklassifizierungsschema nach der EG-Verordnung Nr.2406/96 über gemeinsame Vermarktungsnormen für Fischereierzeugnisse.

<b>Friskheklaffen</b>				
	<b>Extra</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Aussehen</b>				
<b>Haut</b>	Kräftig glänzend, Schleim wasserklar	Matt, Schleim trüb	Matt, Schleim milchig	Matt, Schleim bräunlich trüb
<b>Augen</b>	Glänzend, konvex, durchsichtig schwarz	Konvex mit eingesunkener Mitte, leichte Trübung	Flach, Pupille trüb	Eingesunken, Hornhaut milchig, Pupille trüb
<b>Kiemen</b>	Leuchtende Farbe ohne Schleim	Blassere Farbe, etwas klarer Schleim	Blass mit fleckiger Färbung, trüber Schleim	Blass oder fleckig, viel rötlicher bis brauner Schleim, Struktur-Auflösung
<b>Färbung Peritoneum und Bauchhöhle</b>	Ohne Verfärbung	Leichte Verfärbung im vorderen Bereich	Gelbliche bis rosafarbene Färbung bis zum Grätenende	Dunkle, bräunliche Färbung
<b>Beschaffenheit</b>				
<b>Festigkeit Peritoneum</b>	Fest anliegend	Anliegend	Ablösbar, zerreißt bei starkem Druck	Leicht ablösbar, Gräten springen bei Aufbiegen der Leibeshöhle vor
<b>Muskelfleisch</b>	Fest elastisch Bauch und Rücken	Verminderte Elastizität, v.a. im Bauchbereich, Eindrücke verschwinden verzögert	Leicht weich, Eindrücke verschwinden nicht vollständig, auch am Rücken auf Druck nachgebend und in großen Stücken zerfallend	Weich, Eindrücke bleiben, Muskel musig
<b>Geruch Kiemen, Geruch Leibeshöhle</b>	Frisches Teichwasser	Neutral	Leicht abweichender, aber nicht unangenehmer Geruch: sauer, fruchtig, bitter stechend	Geruch blutig, fischig, stechend, verwesend, parfümig

Eine Stunde vor der Beurteilung des Frischegrades wurden die Regenbogenforellen aus dem Eis genommen und bei Raumtemperatur (+ 20°C) zur Untersuchung bereitgestellt. Ein Team von 4 bis 5 Personen beurteilte anhand des in den

Vorversuchen entwickelten Klassifizierungsschemas die äußere und innere Beschaffenheit der Versuchsfische. Als Kriterien der äußeren Beschaffenheit wurde das Aussehen der Augen (Turgor, Hornhauttrübung), der Haut (Farbe und Schimmer, Konsistenz und Farbe des Schleimes) und der Kiemen herangezogen, als Kriterien der inneren Beschaffenheit die Konsistenz des Muskels (Elastizität und Farbe) und der Kiemen (Farbe und Schleim) sowie der Geruch von Kiemen und Leibeshöhle. In den einzelnen Testreihen füllte jeder Prüfer ohne Absprache mit den anderen Prüfpersonen einen Bewertungsbogen aus. Die Merkmalskriterien wurden einzeln bewertet und dann aufgrund des Gesamteindrucks zu einer Gesamtbewertung zusammengefasst. Das Prüfverfahren war eine "Beschreibende Prüfung", wie sie in L 00.90-1 und L 00.90-6 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG beschrieben ist. Aufgrund der Ergebnisse konnte anschließend ein spezifischer Bewertungsbogen zur Bestimmung des Frischegrades von Regenbogenforellen (Tabelle 13) erstellt werden. Bei der Klasseneinteilung bedeutet die Klasse E Extra-Qualität, A ist gute Qualität, B ist akzeptable Qualität, und in die Klasse C wurden die Fische eingeordnet, die nicht mehr als verkehrsfähig einzustufen sind. Abweichend vom EU-Schema wurden Zwischenstufen verwendet, um auch kleinere Unterschiede zwischen leeren und vollen Fischen erfassen zu können. Anschließend wurden die Ergebnisse der Qualitätsklassifizierung in Punktzahlen umgewandelt, um die Daten rechnerisch auswerten zu können. Die Klassen erhielten folgende Punktzahlen:

Klasse	E	EA	A	AB	B	BC	C
Punkte	9	8,25	7,5	6,75	5	4	3

Die Klasse BC mit 4 Punkten bildete die Grenze der "Verkehrsfähigkeit". Ab diesem Zeitpunkt ist der Fisch noch verzehrsfähig, es besteht aber keine Restlagerzeit mehr und der Fisch darf nicht mehr zum Verkauf angeboten werden. Ab 3 Punkten wurde die Grenze der "Verzehrsfähigkeit" überschritten, und der Fisch als "Substandard" bezeichnet.



Für die Frischegradbestimmung wurden bei den "Winterforellen" 1999 insgesamt 72 runde und 72 ausgenommene Fische untersucht. Im Herbst 2000 wurde die Bestimmung des Frischegrades an weiteren 90 Regenbogenforellen aus der Kreislaufanlage des BgVV wiederholt. Hierbei sollte neben dem Kriterium des Ausnehmens auch der Einfluss der Fütterung auf den Frischegrad und die sensorischen Eigenschaften der Fischfilets durch eine Kochprobe untersucht werden. Zur Untersuchung standen jeweils 4 bis 5 Prüfer zur Verfügung. Die Frischegrad-Beurteilung (visuell, olfaktorisch und taktil) der äußeren und inneren Beschaffenheit der gelagerten Forellen erfolgte folgendermaßen:

Tabelle 14: Sensorische Untersuchungen (Frischegradbestimmung und Kochprobe) bei Regenbogenforellen, Winter 1999 und Herbst 2000

Versuch	Untersuchungstag	Anzahl Fische pro Tag	
		leer	rund
1999 Winter Gruppe 1 bis 4	1, 3, 7, 10, 13, 15	3	3
2000 Herbst Gruppe 1-nüchtern	4, 7, 9, 11	5	5
2000 Herbst Gruppe 2-nüchtern	7, 9	5	5
2000 Herbst Gruppe 3-gefüttert	1, 4, 7	5	5

In den Herbstuntersuchungen diente ein 2 bis 3 Tage zuvor geschlachteter und ausgenommen gelagerter genüchterter „Referenzfisch“ als Bezugsgröße.

Kochprobe: Als Erweiterung zu den Untersuchungen im Winter 1999 wurde neben der Frischegradbestimmung auch eine sensorische Beurteilung der Filets durch eine Kochprobe durchgeführt. Dazu wurden alle Fische filetiert, die Filets in hitzefeste Kunststoffbeutel eingeschweißt, kodiert und bei + 90°C im Wasserbad in etwa 10 Minuten gegart.

In Vorversuchen, sog. "Kochproben-Seminaren" erfolgte analog zu der Entwicklung eines Frischegradschemas die Definierung und Sammlung von geeigneten Begriffen zur Beschreibung von Geruch, Geschmack, Textur und Aussehen der gegarten Filets. Die Prüfer ermittelten gemeinsam die am besten zutreffenden Begriffe und übten das Er-Schmecken und Er-Riechen der feinen Unterschiede. Das entwickelte Kochprobenschema (Tabelle 15) diente in den Hauptversuchen als Bewertungsgrundlage.





### Auswertung von Frischegradbestimmung und Kochprobe:

Die einzelnen Prüferbewertungen je Fisch und untersuchtem Merkmal wurden für die Auswertung der Frischegrad-Prüfung zusammengefasst. Aus diesen je 3 bzw. 5 Fischbewertungen wurden dann der Mittelwert der Gruppe „ausgenommen“ bzw. „rund“ sowie die Standardabweichungen errechnet und mit Hilfe des Student-t-Testes für verbundene Stichproben (zweiseitig,  $p < 0,05$ ) auf Unterschiedlichkeit geprüft.

Um einen möglichen Einfluss des Nüchterungsgrades auf die Frischegrad- und Kochprobenergebnisse zu untersuchen, wurden bei den Untersuchungen im Herbst 2000 die Mittelwerte der Tage 4 und 7 der Gruppe „nüchtern“ bzw. „gefüttert“, jeweils für ausgenommene und nicht ausgenommene getrennt, miteinander verglichen. Da die Prüfung der beiden Gruppen nicht gleichzeitig, sondern im Abstand von 14 Tagen stattfand, kam hier der t-Test für unabhängige Stichproben (zweiseitig,  $p < 0,01$ ) bei beiden Untersuchungen zur Anwendung.

#### 3.2.2.3 Frischegrad-Bestimmung und Kochprobe bei Zander

Die Frischegrad- und Kochproben-Prüfung beim Zander wurde mehrfach verschoben, da im Fanggebiet vor der Insel Usedom, woher die Fische für die Vorversuche und für die mikrobiologischen Untersuchungen stammten, keine Zander in ausreichender Zahl gefangen wurden. Aus diesem Grunde wurde eine Gruppe aus einem anderen Fanggebiet (Darßer Bodden bei Ribnitz/Damgarten) mit 21 Fischen von erheblichem Gewicht gekauft (Gruppe 4). Die Fische waren beim Eintreffen schon drei Tage unausgenommen gelagert worden und wiesen zu diesem Zeitpunkt bereits Veränderungen in der Bauchhöhle durch Autolyse auf. Je Untersuchungstag standen nur 3 ausgenommene und 3 runde Fische zur Verfügung.

Der Versuch wurde einen Monat später wiederholt, diesmal wieder mit Fischen aus dem Bodden bei Usedom (Gruppe 5). Es standen je 5 ausgenommene und runde Fische pro Untersuchungstag zur Verfügung. Diese wurden am Tag des Fanges nach Berlin in Eis transportiert und am nächsten Morgen ausgenommen und gewaschen.

Sowohl das Frischegradschema als auch der Beurteilungskatalog für die Kochprobenbeschreibungen wurden ebenso wie bei den Forellen in Vorversuchen

entwickelt. Begriffe wurden gemeinsam von allen Prüfern gesammelt und für die einzelnen Kriterien festgelegt.

Im Unterschied zum Frischegradschema für Forellen wurden einige Kriterien weiter aufgeteilt. So wurde bei der Beurteilung der Augen in Augäpfel und Hornhaut unterschieden, da Veränderungen bei Augäpfel und Hornhaut getrennt auftreten konnten und zu unterschiedlichen Lagerungszeiten beobachtbar und bewertbar waren. Eine Schwierigkeit ergab sich hierbei bei der Feststellung der Augentrübung durch die reflektierende Netzhautschicht ("Tapetum lucidum"). Auch ein Einsinken der Augäpfel durch die Schwerkraft beim oberen Auge führte zu unterschiedlichen Bewertungen der beiden Augen eines Fisches. Farbe und Schleimbeschaffenheit der Kiemen wurden in zwei Bewertungskategorien eingeteilt, da die Entwicklung des Kiemenschleimes im Laufe der Lagerung unabhängig von der Kiemenfarbe verlief. In den ersten Tagen der Lagerung galt auch die Festigkeit der Schuppen als Frischekriterium. Ein weiterer grundlegender Unterschied zwischen Forellen und Zandern ergab sich am Peritoneum, welches beim Zander grauer, dicker und fester als bei der Forelle war. Die Ablösbarkeit des Peritoneums stellte hier neben der damit einhergehenden Farbveränderung der Bauchlappen (Graugelbfärbung) ein besseres Kriterium dar als bei der Forelle.

Die Frischegraduntersuchung erfolgte in beiden Versuchsgruppen durch drei bis vier Prüfer anhand des in Tabelle 16 aufgeführten Schemas. Analog zu der Frischegradbewertung bei den Forellen wurde die Gesamtnote in Punkten von 3 bis 9 verteilt, fangfrische Fische erhielten 9 Punkte, und 4 Punkte stellten die Grenze der Verkehrsfähigkeit dar.

Zusätzlich wurden Kriterien wie das Geschlecht, die Füllung und der Zustand des Darmes sowie die Bildung von Flüssigkeit im Bauchraum beobachtet.



Da es sich um verbundene Stichproben mit ordinalen Daten handelt (ein Prüfer beurteilte beide Gruppen), wurden die Mittelwerte für die jeweilige Gruppe je Prüfer gebildet und die mittlere Bewertung aller Prüfer pro Gruppe sowie jeweils die Differenzen zwischen ausgenommenen und runden Fischen pro Prüfer errechnet.

Für die Kochprobe der Filets wurden die Zander im Anschluss an die Frischegrad-Beurteilung filetiert. Ein ausreichend großes Stück des Rückenfilets wurde in einen kochfesten Folienbeutel eingeschweißt und in 10 bis 12 Minuten bei + 90°C im Wasserbad gegart. In den Vorversuchen entstand nach einigen Runden der Begriffssammlung der in Tabelle 17 wiedergegebene Bewertungsbogen, mit dessen Hilfe die Beurteilung durch 4 bis 7 Prüfer in verdeckter Bewertung mit kodierten Proben erfolgte.

Tabelle 17: Bewertungsbogen für die Bestimmung der Filetbeschaffenheit von Zandern durch die Kochprobe

Punkte	Geruch	Aussehen	Mundgefühl	Geschmack	Punkte
100	Fisch, Seewasser, schwach süß	weiß/elfenbein, fest-elastisch, Myomer zusammenhängend	fest, trocken	Seewasser, schwach Fisch	100
80	Muscheln, grüne Pflanzen, Stärke, Kartoffel		elastisch-fest, saftig	mild aromatisch, Stärke, Kartoffel	80
70	neutral	weicher, Myomer teilt sich	trocken, weniger fest	sahnig, buttrig, neutral	70
60	gekochtes Gemüse, würzig	Flüssigkeit tritt auf Druck aus	zart	fade, gemüsig	60
50	dumpf, säuerlich	sehr weich, geronnenes Eiweiß	weich, etwas wäßrig	dumpf, leicht sauer/bitter	50
40	muffig, sauer, fruchtig süßlich, leicht bitter /metallisch/ stechend	gelblich-grau, musig, viele kleine Fasern	sehr weich, wäßrig	schal, muffig, deutlich abweichend	40
30	stark sauer, bitter, metallisch, stechend	gelb, grau, braun, glasig, matschig	musig, stark wäßrig	sauer, bitter, metallisch	30
	bittere Nüsse				
0	seifig, faulig, Kohl		breiig	faulig, seifig	0
Kriterien	angenehm neutral unangenehm	Farbveränderung, Verlust Faser- zusammenhalt	Verlust Wasserbindung, Festigkeit	angenehm neutral unangenehm	

Der Geruch wurde im Laufe der Lagerung mit Begriffen ausgehend von Fisch und Seewasser über gekochtes Gemüse und dumpf säuerlich bis hin zu muffig, bitter-nussig und seifig, faulig, kohlsartig beschrieben. Ähnliche Begriffe ließen sich für den Geschmack finden, von Seewasser über fade, gemüsig bis zu bitter, metallisch und faulig. Das Aussehen entwickelte sich von weiß/elfenbeinfarben und fest-elastisch über weich mit geronnenem Eiweiß bis zu einem grauen, braunen und glasigen Aussehen und matschiger Konsistenz. Das Mundgefühl veränderte sich von fest-trocken über zart, weich-wäßrig zu einem musigen und breiigen Empfinden beim Kauen. Für ausgenommene und runde Fische wurden die Mittelwerte je Prüfer gebildet und verglichen.

### 3.2.3 Probenentnahme für bakteriologische, chemische und parasitologische Untersuchungen

#### 3.2.3.1 Probenentnahme bei Zandern

Die bakteriologischen Untersuchungen erfolgten an den Versuchsfischen der Gruppe 3. An den Lagerungstagen 1, 3, 7, 11 und 14 wurden jeweils 5 leere und 5 volle Fische den Eislagerkisten entnommen. Es wurden Proben von der Haut, der Rückenmuskulatur und bei vollen Fischen vom Darm genommen. Tabelle 18 zeigt das Probenentnahmeschema sowohl für die mikrobiologischen als auch für die parasitologischen und chemischen Untersuchungen.

Tabelle 18: Probenentnahmeschema der Untersuchungen an Ostsee-Zander, Gruppe 3 (Januar 2001), BU- Bakteriologische Untersuchung (GKZ, SSO, Pseudomonaden)

	<b>Untersuchung</b>								
<b>Tag</b>	<i>Listeria</i> <i>Vibrio</i> <i>Aerom.</i>	BU Haut	BU Darm	BU Muskel	Clostridien (in Darm und Bauchlappen)	<i>Enterobac- teriaceae</i> Haut/Darm	TVBN	<i>Anisakis</i> Einge- weide	<i>Anisakis</i> Musku- latur
<b>0</b>	x								
<b>1</b>		x	x	x	x		x	x	x
<b>3</b>				x				x	x
<b>7</b>		x	x	x		x	x	x	x
<b>8</b>					x			x	x
<b>11</b>		x	x	x			x	x	x
<b>14</b>		x			x		x	x	x

Zur Entnahme der Hautprobe wurde eine sterile Papierschablone mit 10 cm<sup>2</sup> Fläche craniolateral der Rückenflosse auf die Haut gelegt, mit sterilem Besteck umschnitten und abgezogen. Die Papiervorlage ging zusammen mit der Hautprobe in die weitere Probenaufbereitung mit ein.

Zur Entnahme der Muskelprobe wurde die Haut auf der Rückenoberseite hinter dem Kopf großflächig aufgeschnitten, abgezogen und in 0,5 cm Abstand von den Schnittstellen 10 g Muskelgewebe entnommen. Es wurde besonders darauf geachtet, nicht die Schnittfläche von der Hautentnahme einzubeziehen.

Zur Entnahme der Darmprobe wurde der Bauch der vollen Fische halbkreisförmig aufgeschnitten und nach unten aufgeklappt (Abbildung 3), so dass eine Darmprobe leicht entnommen werden konnte, ohne Organe und Bauchhöhle zu kontaminieren. Ein Teil des Enddarmes wurde von dem restlichen Darm und den Eingeweiden abgeschnitten, davon 10 g eingewogen und für die Untersuchung herangezogen. Die Proben dienten dem quantitativen Nachweis von aerober GKZ, Shewanellen, Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae*.

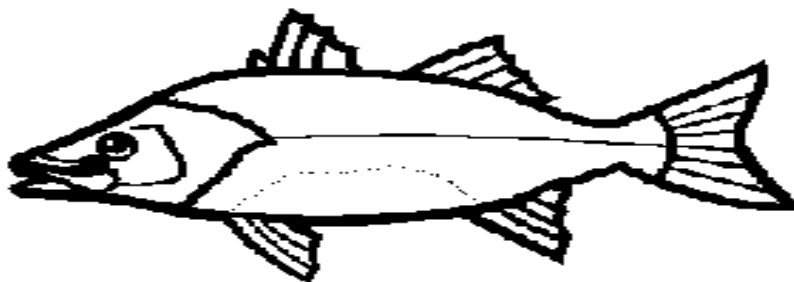


Abbildung 3: Runder Bauchschnitt bei der Entnahme der Darm- und der Bauchlappenproben, Schnittstelle (.....)

Für qualitative Untersuchungen auf die humanpathogenen Keime Listerien, Vibrionen und Aeromonaden wurde die Haut der Fische auf eine mögliche äußerliche Keimbelastung mit Hilfe von Tupferproben untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten nur am ersten Tag. Unmittelbar nach dem Umladen der Fische in die Transportkisten wurde von 10 Fischen ein Hautabstrich mit einem Wattetupfer genommen für den Nachweis von Aeromonaden und Vibrionen. Mit einem weiteren Tupfer wurde ebenso bei der Listerienbestimmung vorgegangen.

Ein Vorhandensein von anaeroben humanpathogenen Clostridien wurde qualitativ geprüft im Bauchraum und im Darm der Fische, um festzustellen, ob Clostridien im

Bauchraum vorkommen können und ob während der Lagerung eine Vermehrung stattfinden kann. An den Untersuchungstagen 1, 8 und 14 wurden nach dem Aufschneiden des Bauches der 5 vollen Fische je 2 Tupferproben der Bauchlappeninnenwände und je 2 x 1 g des Enddarms (Gewebe + Darminhalt) entnommen.

Nach der Entnahme der Haut-, Darm- und Rückenmuskelproben und der Bauchlappenmuskel-Tupferproben für die bakteriologische Untersuchung wurden zur parasitologischen Untersuchung der gesamte Magen-Darm-Trakt entnommen sowie die enthäuteten Filets und die Bauchlappen. Ferner gingen komplette enthäutete Rückenfilets in die Untersuchung auf den TVB-N-Gehalt ein.

### 3.2.3.2 Probenentnahme bei Regenbogenforellen

Die Orte der Probenentnahme sowie die Probenmatrizes bei den Regenbogenforellen variierten während des gesamten Untersuchungszeitraumes. Beim ersten Versuchsabschnitt im Winter 1999 wurden Hautproben und Muskelproben des vorderen Rückenmuskels genommen. Bei den späteren Versuchen mit Forellen im Sommer 2001 wurde die Haut, der Darm und das Bauchlappenmuskelgewebe untersucht, um gezielt die Vorgänge im runden Fisch zu beobachten.

Für die bakteriologischen Untersuchungen im Winter 1999 wurden in 4 Durchgängen insgesamt 60 volle und 60 leere Fische untersucht. Pro Versuchsdurchgang kamen 15 leere und 15 volle Fische zum Einsatz. Die Keimbelastung der ausgenommenen und nicht ausgenommenen Fische wurde an den Lagerungstagen 0, 7, 10, 13, 15 ermittelt. An jedem Beprobungstag wurden 5 ausgenommene und 5 nicht ausgenommene Fische untersucht. Dabei konnte aus einem Fisch an 2 aufeinanderfolgenden Versuchstagen jeweils eine Probe entnommen werden.

Mit Hilfe einer sterilen Schablone mit einer eingestanzten rechteckigen Öffnung (5 x 2 cm) aus Metall, sterilem Skalpell und Pinzette wurden vorsichtig 10 cm<sup>2</sup> Haut abpräpariert und 10 g des darunter liegenden Muskelgewebes aus dem vorderen Teil der Rückenmuskulatur des Fisches entnommen. Die auf diese Weise gewonnenen Proben dienten dem Nachweis von Gesamtkeimzahl, Pseudomonaden, Aeromonaden, *Enterobacteriaceae*, Clostridien.

Für den qualitativen Listeriennachweis wurde an den Lagerungstagen 0 und 15 mit einem sterilen Wattetupfer bei jeweils 5 runden und 5 leeren Fischen eine 10 cm<sup>2</sup> große Hautoberfläche betupfert und an den Lagerungstagen 7, 10, 13 und 15 jeweils 10 g Gewebe mit der oben beschriebenen Methode entnommen. Darüber hinaus wurden in der Teichwirtschaft Tupferproben von Beckenrändern, Arbeitsplatte und Geräten zum Ausnehmen der Fische genommen, um eine Kontamination der Umgebung mit Listerien zu überprüfen.

Für den Salmonellennachweis wurde ebenfalls am 0. und 15. Tag der Lagerung eine Tupferprobe der Haut und eine Muskelprobe gezogen, um festzustellen, ob die Fische am Anfang der Untersuchung Salmonellen enthielten und ob diese sich während der Lagerungsdauer vermehren konnten.

Für die bakteriologischen Untersuchungen an den „Sommerfischen“ im Sommer 2001 wurden in 3 Durchgängen Proben vom Darmgewebe und von der Bauchlappenmuskulatur genommen. Hierbei ging es in erster Linie darum, mikrobielle Vorgänge im Bauchraum zu beobachten. Zusätzlich wurde beim ersten Durchgang eine 2 x 5 cm große Hautprobe aus dem vorderen Dorsalbereich geschnitten, um die äußerliche Bakterienbelastung der Sommerfische mit der Belastung der Winterfische vergleichen zu können. In der Tabelle 19 sind die Einzelheiten der Untersuchungen und die unterschiedlichen Fragestellungen der 3 Durchgänge aufgeführt.

Für die Entnahme der Darm- und Bauchlappenproben wurde wie bei der Entnahme der Darmproben bei den Zandern vorgegangen. Der Bauch des Fisches wurde durch einen Rundschnitt steril eröffnet. Der gesamte Darm ging in die Untersuchung ein. Im Durchschnitt wogen die untersuchten Därme 4,1 +/- 1,17 g. Nach der Entfernung der Eingeweide wurde ca. 2 bis 3 Gramm Muskelgewebe unterhalb des hinteren Darmabschnittes aus dem Bauchlappen steril entnommen. Bei den bereits ausgenommenen Fischen wurde der obenliegende Bauchlappen entfernt, so dass die Liegeseite des Fisches nach Entfernung der Gräten beprobt werden konnte.

Der qualitative Listeriennachweis erfolgte anhand von 10 Hauttupfern als Eingangsuntersuchung nach der Ankunft der Fische im Institut. Ebenso wurden für den Salmonellennachweis an jedem Probenentnahmetag von 5 Fischen mit Tupfern Hautabstriche gemacht sowie Darmproben 5 voller Fische gepoolt.



Tabelle 19: Bakteriologische Untersuchungen an Regenbogenforellen im Sommer 2001, Probenahme und Untersuchungen in 3 Durchgängen

Versuch	Fragestellung	Anzahl Fische		Proben-entnahme-tage	Fische pro Untersuchung	Untersuchungs-spektrum, Keime
		leer	rund			
<b>I Juni 2001</b>	Ermittlung des Keimstatus im Sommer im Vergleich zur Winterbelastung	25	25	1, 4, 7, 11, 13	5 leere, 5 volle; Haut, Darm, Bauchlappen	GKZ, <i>Listeria</i> , Pseudomonaden, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Salmonella</i> ,
<b>II Juli 2001</b>	Ermittlung des genauen Übertritts von Keimen aus dem Darm in Bauchhöhle	-	80	0, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8	10 runde; Darm, Bauchlappen	GKZ
<b>III August 2001</b>	Einfluss der Schlachthygiene auf die Keimbelastung der Bauchhöhle	40 (+20)	60 (20)	0, 3, 6, 9	10 runde, 10 leere 10 rund-leere an Tag 6 und 9; Darm, Bauchlappen	GKZ

Durchgang III: als rund-leer werden Fische bezeichnet, die erst 6 Tage rund lagerten, dann ausgenommen wurden und als leere Fische an den Probenahmetagen 6 und 9 untersucht wurden, als Zahlen in Klammern dargestellt

### 3.2.4 Mikrobiologische Untersuchungen

Die mikrobiologischen Untersuchungen dienten einerseits der Erfassung von Verderbniserregern und deren Entwicklung auf Fischgewebe, andererseits der Ermittlung des Vorkommens einiger humanpathogener Keime und Indikatorkeime auf der Haut, in der Muskulatur und im Darm von gelagerten Fischen.

Tabelle 20 zeigt das Keimspektrum, welches bei den unterschiedlichen Versuchsgruppen und Fischarten untersucht worden ist. Dabei wird in einen qualitativen und einen quantitativen Nachweis unterschieden. Einige Keimarten wie die Clostridien und die Aeromonaden wurden je nach Fischart entweder qualitativ oder quantitativ nachgewiesen.

Tabelle 20: Keimspektrum bei der Untersuchung von Regenbogenforelle und Zander

		quantitativ							qualitativ			
		GKZ	Pseudo- monaden	Shewanel- len	Entero- bacteriace	Aeromo- naden	Clostridien	Salmonel- len	Listerien	Vibrien	Aeromo- naden	Clostridien
Winterforelle	H	x	x		x	x	x	x	x			
	RM	x	x		x	x	x	x	x			
Sommerforelle	H	x	x		x			x	x			
	BL	x	x		x							
	D	x	x		x			x				
Zander	H	x	x	x	x				x	x	x	
	RM	x	x	x								
	D	x	x	x	x							x
	BL											x

H = Haut, RM = Rückenmuskel, BL = Bauchlappengewebe, D = Darm, GKZ = aerobe Gesamtkeimzahl

Zur Feststellung des Keimstatus von Regenbogenforellen in den Sommermonaten im Vergleich zu den Winterfischen umfasste das Keimspektrum im ersten der drei Durchgänge neben den Verderbparametern aerobe Gesamtkeimzahl und Pseudomonaden auch die *Enterobacteriaceae* und humanpathogene Keime wie Salmonellen und Listerien.

In der Tabelle 21 ist das Untersuchungsspektrum für den ersten Durchgang der Untersuchungen im Sommer 2001 zusammengefasst.

Tabelle 21: Untersuchungsspektrum der qualitativen und quantitativen Keimerfassung bei Regenbogenforellen, Durchgang Nr. 1 im Sommer 2001

Tag der Lagerung	Tag 1	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 11/12
Qualitativ	Listerien (H) Salmonellen (H,D)	Salmonellen (H,D)	Salmonellen (H,D)	Salmonellen (H,D)	Salmonellen (H,D)
Quantitativ	(H, D, BL) aerobe GKZ, <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	(H, D, BL) aerobe GKZ, <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	(H, D, BL) aerobe GKZ, <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	(H, D, BL) aerobe GKZ, <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	(H, D, BL) aerobe GKZ, <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>

H = Haut, D = Darm, BL = Bauchlappen, GKZ= Gesamtkeimzahl

#### 3.2.4.1 Probenaufbereitung für die mikrobiologische Untersuchung

Die Probenaufbereitung und -untersuchung verlief für den jeweiligen Mikroorganismennachweis bei allen Untersuchungen ähnlich; Abweichungen werden für die jeweilige Versuchsgruppe einzeln erwähnt.

Die Probenaufbereitung der Haut-, Darm- und Muskelproben für die Bestimmung von GKZ, Shewanellen, Pseudomonaden, *Enterobacteriaceae* und bei den Forellen der Winteruntersuchung außerdem auch für die Clostridien und die Aeromonaden erfolgte nach dem amtlichen Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, L 06.00-16. Nach einer 1:9- Erstverdünnung der Haut-, Muskel- und Darmproben mit 0,1 %-igem Peptonwasser wurden die Proben in sterile Stomacherbeutel gegeben und 2 Minuten in einem Beutel-Walkmischgerät homogenisiert. Aus 1 ml der so erhaltenen Erstverdünnung wurde eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt für die weitere Keimzahlbestimmung nach unterschiedlichen Methoden. Das Peptonwasser für die Dezimalverdünnungen beim Zandergewebe enthielt zusätzlich 1 % NaCl, da die untersuchten Organismenarten z.T. zum Wachstum eine Mindest-Salzkonzentration benötigen.

Die Probenaufbereitung für den qualitativen Nachweis für Listerien bei beiden Fischarten fand nach der Methode DIN EN ISO 11290-1 statt. Die Tupferproben der Haut wurden in Röhrchen mit 10 ml des ersten selektiven Anreicherungsmediums 1/2-Fraser-Bouillon gegeben und 10 g des Forellenmuskelgewebes in 90 ml des Anreicherungsmediums gelegt und 24 Stunden bei + 30°C bebrütet. Nach Ablauf der ersten Bebrütung wurde das zweite Anreicherungsmedium Fraser-Bouillon mit vollständiger Konzentration an selektiven Agentien mit 0,1 ml der ersten Anreicherung beimpft und 48 Stunden bei + 37°C bebrütet.

Für die Probenaufbereitung des Salmonellennachweises bei den Forellen der Sommer- und der Winterdurchgänge wurden die Tupferproben der Haut, die gepoolte Darmprobe und die 10 g Muskelprobe gemäß § 35 LMBG, L 00.00-20 aufbereitet. Es erfolgte eine Voranreicherung in 90 ml gepuffertem 1 %-igem Peptonwasser, die 16 bis 20 Stunden bei + 37°C bebrütet wurde. Im Anschluss wurde das selektive Anreicherungsmedium Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Medium mit 0,1 ml der bebrüteten Kultur beimpft und 24 Stunden bei + 42°C bebrütet.

### 3.2.4.2 Quantitativer Nachweis der Verderbniserreger

Der Nachweis der Verderbniserreger (aerobe Gesamtkeimzahl, Pseudomonaden, Shewanellen) in den Haut-, Darm- und Muskelproben erfolgte aus den Dezimalverdünnungen in Peptonwasser. Dabei wurde bei den Haut- und Darmproben beider Fischarten und bei den Muskelproben der Forellen nach Methoden der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 vorgegangen. Es kam das Spatelplattenverfahren (L 06.00-18: Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl bei + 30°C in Fleisch und Fleischerzeugnissen) und das Tropfplattenverfahren (L 06.00-19: Bestimmung der aeroben Keimzahl bei + 30°C in Fleisch und Fleischerzeugnissen) zur Anwendung.

Die beiden amtlichen Methoden schreiben vor, dass bei der Auswertung der Kolonienzahl die Sektoren bzw. Platten mindestens einer Verdünnungsstufe zwischen 5 und 50 (eventuell bis 100, falls gut auszählbar) Kolonien beim Tropfplattenverfahren bzw. 20 und 300 Kolonien beim Spatelplattenverfahren aufweisen müssen. Aus den Kolonienzahlen der niedrigsten und der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe wird der gewichtete Mittelwert  $c$  errechnet. Die Anzahl der Mikroorganismen pro g oder cm<sup>2</sup> wurde nach folgender Zahlenwertgleichung berechnet:

$$c = \frac{\sum X_i}{n_1 * 1 + n_2 * 0,1} * d$$

Es bedeuten:

- $c$  = gewichteter Mittelwert der Koloniezahlen,
- $\sum X_i$  = Summe der Kolonien aller Sektoren bzw. Platten, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächst höhere auswertbare Verdünnungsstufe);
- $n_1$  = Anzahl der Sektoren bzw. Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe;
- $n_2$  = Anzahl der Sektoren bzw. Platten der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe;
- $d$  = Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe (auf  $n_1$  bezogen).

Da beim Tropfplattenverfahren die Plattenimpfmenge von 0,05 ml einer weiteren Verdünnung des Röhrcheninhalts von 1:20 entspricht, wird  $c$  mit 20 multipliziert, beim Spatelplattenverfahren mit einer Impfmenge von 0,1 ml analog mit 10.

Die Keimzahl je g oder cm<sup>2</sup> der Probe wird durch Multiplikation des c-Wertes mit dem Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe erhalten.

Die Berechnung der Keimzahl unterliegt einigen Einschränkungen. Die Angaben für das Spatelplattenverfahren stehen in Klammern hinter denen für das Tropfplattenverfahren:

- a) Haben sich auf den mit der größten Probenmenge beimpften

Doppelsektoren jeweils weniger als 5 (20) Kolonien gebildet, lautet das Ergebnis bei verdünnten homogenisierten Proben:

"Weniger als  $1,0 \cdot 10^3$  ( $2,0 \cdot 10^3$ ) KbE/g oder cm<sup>2</sup>"

In die Berechnungen gingen diese Werte in der logarithmischen Form mit log 3 (log 3,3) KbE/g oder cm<sup>2</sup> ein. Dieser Wert stellt die Quantifizierungsgrenze dar, oberhalb der erst präzise Angaben über den tatsächlichen Keimzahlwert gemacht werden können.

- b) Haben sich auf den mit der größten Probenmenge beimpften

Doppelsektoren keine Kolonien gebildet, lautet das Ergebnis bei verdünnten homogenisierten Proben:

"Weniger als  $2,0 \cdot 10^2$  ( $1,0 \cdot 10^2$ ) KbE/g oder cm<sup>2</sup>".

In die Berechnungen gingen diese Werte in der logarithmischen Form mit log 2,3 (log 2) KbE/g oder cm<sup>2</sup> ein. Dieser Wert stellt die Nachweisgrenze dar.

Da durch diese methodisch festgelegten Einschränkungen keine Nullwerte auftreten können, liegen die Mittelwerte der Stichproben immer über log 2,3 (log 2,0), auch wenn beispielsweise bei 3 von 5 Proben keine Kolonien auf den Doppelsektoren gewachsen sind.

#### 3.2.4.2.1 Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl (GKZ)

Bei der Bestimmung der aeroben GKZ auf der Haut und im Muskelgewebe der „Winterforellen“ 1999 wurde das Tropfplattenverfahren angewendet. Mit einer sterilen Pipette wurden Teilmengen von 0,05 ml der Erstverdünnung und der weiteren Verdünnungsstufen im Doppelansatz auf die auf der Plattenunterseite markierten Sektoren des PC-Nährbodens aufgetropft, bebrütet wurde bei + 25°C 48 bis 72 Stunden. Gezählt wurden alle Kolonien, die auf PC-Agar gewachsen waren.

Im Gegensatz dazu wurde bei der Bestimmung der Gesamtkeimzahl der Bauchlappenmuskelpuben der „Sommerforellen“ und der Haut- und Darmproben sowohl der Forellen als auch der Zander das Spatelplattenverfahren mit einer größeren Beimpfungsmenge angewendet. Zudem wurde beim Zander für die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl und der spezifischen Verderbskeime anstelle des PC-Agars ein modifizierter Standard-I-Eisen-III-Citrat-Agar verwendet, auf dem die spezifischen Verderbniskeime (v.a. *Shewanella putrefaciens*) durch Bildung von H<sub>2</sub>S schwarze Kolonien formen. Mit sterilen Pipetten wurde aus den Verdünnungsreihen jeweils 0,1 ml der entsprechenden Verdünnung im Doppelansatz auf Agarplatten gegeben und mit sterilen Glasspateln gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Die Platten wurden 48 Stunden bei + 25°C bebrütet, die Kolonien anschließend gezählt.

Abweichend vom Spatelplattenverfahren wurden die Keimzahlen der Muskelproben bei Zandern nach einem 5-tube-MPN-Verfahren bestimmt. Hierbei wurden die Muskelproben ebenso wie die Haut- und Darmproben im Verdünnungsmedium homogenisiert und dezimal bis 10<sup>-3</sup> verdünnt. Anschließend wurden von jeder Verdünnungsstufe 5 Tropfen (je 50 µl) auf je eine Standard-I-Eisen-III-Citrat-Agar-Platte getropft. Nach 48 Stunden Bebrütung bei + 25°C erfolgte die Auswertung mit Hilfe einer "five-tube-MPN" Tabelle (FDA Bacteriological Analytical Manual, 8<sup>th</sup> Edition /Revision A/1997; Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions, Wallace E. Garthright). Alle Sektoren mit gewachsenen Kolonien wurden für die Bestimmung der GKZ gezählt, einschließlich der schwarzen Kolonien der spezifischen sulfitreduzierenden Verderbsorganismen SSO. Der Code sollte möglichst immer mit einer in allen Sektoren positiven Verdünnungsstufe beginnen.

Für die Auswertung wurde aus drei zusammenhängenden Verdünnungsstufen ein Zahlencode, bestehend aus der Zahl der bewachsenen Sektoren pro Verdünnungsstufe, gebildet. Dieser Zahlencode wurde in der 5-tube-MPN-Tabelle in eine "Höchstwahrscheinliche Keimzahl" übersetzt, mit 20 multipliziert, um das tatsächlich aufgetropfte Inoculum von 0,005 g pro Tropfen auf das für die Berechnung notwendige Inoculum von 0,1 g zu bringen, und anschließend pro 1 g oder 1 cm<sup>2</sup> angegeben.

Dieses Verfahren wurde ebenfalls beim Durchgang 3 der „Sommerforellen“ aufgrund der zu erwartenden niedrigen Keimzahlen auf den Bauchlappen unausgenommener Fische verwendet, da es mit einer Nachweisgrenze von < 40 KbE/g (log 1,6) empfindlicher als das Spatelplattenverfahren nach § 35 ist.

#### 3.2.4.2.2 Nachweis der *Pseudomonaden*

Für die Bestimmung der *Pseudomonaden*-Keimzahl wurde GSP-Agar (*Pseudomonaden*-*Aeromonaden*-Selektivagar mit Penicillin nach Kielwein, Merck Art-Nr.1.10230.0500) verwendet. Dabei wurde in den verschiedenen Versuchsgruppen und Fischarten wie bei der Gesamtkeimzahl vorgegangen. *Pseudomonaden* wachsen hier als rosa Kolonien mit einem Durchmesser von 2-3 mm. Die Morphologie kann unterschiedlich sein, rauhe oder glatte Ränder bilden sich je nach *Pseudomonas*-Art aus. Die Berechnung der Keimzahl erfolgte auf die gleiche Weise wie die Berechnung der aeroben Gesamtkeimzahl.

#### 3.2.4.2.3 Nachweis der *Shewanellen* bei Zandern

Zu den spezifischen sulfitreduzierenden Verderbsorganismen (SSO), die auf Standard-I-Eisen-III-Citrat-Agar schwarze, meist glänzende Kolonien bilden, wurde hauptsächlich die Gruppe der *Shewanellen* gezählt. Die Bestimmung erfolgte gleichzeitig mit der Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl auf dem selben Selektivmedium.

### 3.2.4.3 Nachweis von potentiell humanpathogenen Keimen und Indikatorkeimen

#### 3.2.4.3.1 Nachweis von *Enterobacteriaceae*

Die Keimzahl an *Enterobacteriaceae* wurde bei den "Winterforellen" und dem ersten Durchgang der "Sommerforellen" nach den Methoden der amtlichen Sammlung nach § 35 LMBG, L 06.00-24 bzw. -25 (Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von *Enterobacteriaceae* in Fleisch - Spatelverfahren bzw. Tropfplattenverfahren) bestimmt. Nach dem Tropfplatten- und dem Spatelplattenverfahren wurde VRBG-Nährmedium, ein *Enterobacteriaceae*-selektiver Nähragar, mit 0,05 bzw. 0,1 ml des Inoculums beimpft. Bebrütet wurde anaerob in einem Anaerobiertopf 48 Stunden bei einer Temperatur von + 30°C. *Enterobacteriaceae* bilden auf VRBG-Agar rote Kolonien mit Präzipitationshöfen. Gezählt wurden auch kleinere Kolonien ohne Präzipitationshöfe. Die Keimzahl wurde auf die gleiche Weise wie die aerobe Gesamtkeimzahl berechnet.

Beim Zander wurde das MPN-Verfahren nach ISO 21528-2: 2000 (E) - *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 2: Detection and MPN technique without pre-enrichment*-, gewählt, da aufgrund der Vorversuche von einer geringen Keimzahl ausgegangen wurde. Diese MPN-Technik wird empfohlen, wenn eine Koloniezahl von 1 bis 100 pro ml oder g der Probe erwartet wird.

Die Bestimmung des Gehaltes an *Enterobacteriaceae* erfolgte nur am Tag 7 der Lagerung. Untersucht wurde ein Vorhandensein von *Enterobacteriaceae* in Haut- und Darmproben.

Eine Anreicherung der Proben erfolgte in je 9 Röhrchen mit gepufferter Brillant-Grün-Gallesalz-Glucose-Bouillon bei + 37°C über 24 Stunden. Anschließend wurde aus jedem Röhrchen auf VRBG-Agar ausgestrichen und ebenfalls 24 Stunden bei + 37°C bebrütet. Von jeder Platte wurden 5 typische rosa oder rote oder auch farblose mucoide Kolonien abgenommen und nach einer Subkultivierung auf Blut- oder Nutrient-Agar für weiterführende biochemische Differenzierungsreaktionen verwendet. Die Anreicherung erfolgte in Medien unterschiedlicher Konzentration:



- in 3 Röhrchen doppelt-konzentriertem Medium; 10 ml der Ausgangsverdünnung ( $10^{-1}$ ) geben;
- in 3 Röhrchen einfach-konzentriertem Medium 1 ml der Ausgangsverdünnung geben;
- in 3 Röhrchen einfach-konzentriertem Medium 1 ml der ersten Dezimalverdünnung ( $10^{-2}$ ) der Ausgangsverdünnung geben.

Verdächtige Kolonien auf VRBG-Agar wurden nach der Subkultivierung auf ihre Oxidaseaktivität und auf die Fähigkeit, Glucose fermentativ abzubauen, überprüft. Die Bestimmung der MPN erfolgt nach folgenden Kriterien:

Wenn eine der typischen Kolonien der Subkultur oxidase-negativ und glucose-positiv ist, wird das Röhrchen, aus dem die Subkultur stammt, als positiv betrachtet. Röhrchen jeder Verdünnungsstufe mit positiven Ergebnissen werden gezählt. Die Anzahl *Enterobacteriaceae*-positiver Röhrchen der verschiedenen Verdünnungsstufen bildet den MPN-Index. Mit Hilfe einer MPN-Tabelle wird die Anzahl MPN/g bzw. KbE/g ermittelt. Diese ist identisch mit dem MPN-Index bei festen Proben. Bei der Interpretation der Daten ist die Beachtung des 95 %-igen Konfidenzintervalls notwendig.

#### 3.2.4.3.2 Nachweis von Salmonellen

Aus der selektiven Anreicherung wurden zwei feste Selektivmedien (Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar und XLD-Agar) beimpft und 18 bis 24 Stunden bei + 37° C bebrütet. Waren keine Salmonellen gewachsen, wurden die Platten einen weiteren Tag lang bebrütet. Auf Brillantgrün-Phenolrot-Agar (BPLS-Medium) gewachsene Kolonien verursachen eine Farbänderung des Nährbodens von rosa nach rot. Die Kolonien sind rosa und haben einen roten Hof. Auf dem XLD-Medium erscheinen Kolonien von *Salmonella* farblos und transparent und können ein schwarzes Zentrum bilden. Mit jeder verdächtigen oder typischen Kolonie soll laut Norm eine Bestätigung durchgeführt werden. Bei der Auswertung wird die Anwesenheit oder Abwesenheit von Salmonellen in einer Probenmenge von x Gramm (untersuchte Menge) des Produktes angegeben.

### 3.2.4.3.3 Nachweis von Vibrionen und Aeromonaden

Bei den Forellen erfolgte der quantitative Nachweis von *Aeromonas* spp. mit dem Tropfplattenverfahren nur bei den Untersuchungen im Winter 1999. Nach einer 48-stündigen Bebrütung von Ryan-Agar bei + 25°C erscheinen typische Kolonien flach, matt, hellgrün mit einem dunklen Punkt in der Mitte. Verdächtige Kolonien wurden abgenommen und auf Blutagar Nr. 2 einen Tag lang bei + 30°C kultiviert. Eine Gattungsdifferenzierung und eine anschließende Speziesdifferenzierung erfolgte mittels des in der Tabelle 22 aufgeführten Differenzierungsschemas für *Aeromonas* spp.

Tabelle 22: Differenzierungsschema für *Aeromonas* spp. (nach Bockemühl 1992, Mikrobiologische Diagnostik, S. 102; SCHUBERT et al., 1990; JANDA, 1991; JEPPESEN, 1995; SIESENOP und BÖHM, 2000).

	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas veronii</i>	<i>Aeromonas ichthiosmia</i>
Hämolyse	++	+/-	++	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+
OF-Test	+	+	+	+	+
AHM	+	+	+	+	+
<b>Spezies-differenzierung</b>					
Äsculin	+	+	-	+	-
Gas aus Glucose	+	-	+	+	+
Salicinfermentation	+	+	-	+	-
L-Arabinose	+	+	-	-	-
Voges-Proskauer	+	-	V	+	+
Lysin-Decarboxylase	+	-	+	+	-

++: starke, deutliche positive Reaktion, +: positive Reaktion, -: keine Reaktion, V: variabel, unterschiedliche Reaktion

Die detaillierten Beschreibung der Differenzierungsreaktionen von Aeromonaden sind im Anhang in Tabelle A M-1 nachzulesen.

#### Nachweis von Vibrionen bei Zandern:

Die Tupfer der Hautabstriche der Zander wurden in Röhrchen mit 10 ml alkalischem Peptonwasser gegeben und 24 Stunden bei + 37°C bebrütet.

Nach dieser ersten Anreicherung wurde auf TCBS-Agar, einem für Vibrionen selektiven Nährmedium, und auf Ryan-Agar ausgestrichen und 24 Stunden bei + 37°C bebrütet. Zusätzlich wurde 1 ml der ersten Anreicherung in 100 ml einer zweiten Anreicherung, Galle-Pepton-Bouillon, gegeben und 24 Stunden bei + 37°C bebrütet, anschließend auf TCBS- und auf Ryan-Agar ausgestrichen. Verdächtige Kolonien beider Anreicherungen wurden auf Columbia-Agar und auf Schafblutagar zur weiteren Differenzierung subkultiviert. Die Tabelle 23 zeigt ein Differenzierungsschema für *Vibrio* spp.

Tabelle 23: Biologische Merkmale von Vibrionaceae aus klinischem Material (nach BAUMANN et al. 1984, BOCKEMÜHL 1992, Mikrobiologische Diagnostik, S. 102)

	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
TCBS-Agar	gelb	gelb	grün	gelb	grün
Oxidasetest	+	+	+	+	+
Lysin-Decarboxylase	+	+	+	-	+
Ornithin-Decarboxylase	+	d	d	-	+
Arginin-Dehydrogenase	-	-	-	+	-
Gas aus Glucose	-	-	-	-	-
Saccharose	+	+	d	+	-
Salicin	-	-	+	-	-
Arabinose	-	-	-	+	d
Mannit	+	+	d	+	+
ONPG $\beta$ -Galactosidase-Aktivität	+	-	d	d	-
Voges-Proskauer	d	+	-	-	-
Indol	+	d	+	d	+
Zitrat	+	-	d	+	-
O-129 10µg	s	r	s	r	r
O-129 150µg	s	s	s	s	s
Nitrat	+	+	+	+	+
PW mit 0 % NaCl	+	-	-	-	-
PW mit 1 % NaCl	+	+	+	+	+
PW mit 8 % NaCl	-	+	-	d	d
PW mit 10 % NaCl	-	+	-	-	-

+ = Wachstum; - = fehlendes oder sehr schwaches Wachstum, d = unterschiedliches Wachstum mit gelben oder grünen Kolonien, O-129 Vibriostatikum (2,4-Diamino-6,7-diisopropyl-pteridin-Phosphat) Blättchentest mit 10 bzw. 150 µg; r = resistent, s = sensitiv, PW = Peptonwasser

Folgende Untersuchungen und biochemische Tests wurden herangezogen. Den Medien wurde 1 % NaCl zugegeben, um die Wachstumsbedingungen für halophile

Vibrionen zu erleichtern: Aussehen auf Blutagar, Koloniemorphologie und Hämolysefähigkeit, Gramfärbung, Oxidasetest, Kligler (Eisen-2-Zucker-test, Glucose- und Lactosefermentation), Glucose-Oxidation und -Fermentation (O/F-Test), Beweglichkeit, ONPG ( $\beta$ -Galactosidase-Aktivität), Wachstum in Peptonwasser unterschiedlicher Salzkonzentrationen (0 %, 1 %, 3 %, 6 %, 8 %, 10 %), Arginindehydrogenase-Aktivität (ADH), Ornithindecaboxylase-Aktivität (ODC), Lysindecaboxylase-Aktivität (LDC), Voges-Proskauer (VP), API 20 E. Die detaillierten Beschreibung der Differenzierungsreaktionen für Vibrionen finden sich im Anhang in Tabelle A M-2.

#### *3.2.4.3.4 Nachweis von Clostridien*

Bei den "Winterforellen" 1999 erfolgte die Untersuchung auf Clostridien nach der Methode L 06.00-39 in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 (Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von mesophilen sulfitreduzierenden Clostridien in Fleisch und Fleischerzeugnissen - Plattengußverfahren).

Im Doppelansatz wurden 1 ml der Erstverdünnung und wenn nötig der weiteren Verdünnungen in leere Petrischalen überführt und mit 20 ml des geschmolzenen SCA-Nährbodens im Gussplattenverfahren vermischt. Bebrütet wurde 48 Stunden unter anaeroben Bedingungen bei + 37° C. Sulfitreduzierende Clostridien wachsen als schwarze Kolonien im Nährboden.

Bei den Zandern wurde ein qualitativer Nachweis mit Anreicherung der Proben in eisensulfithaltiger Hirn-Herz-Bouillon gewählt. Die Tupferproben der Bauchlappeninnenwände und die Enddarmproben wurden in Röhrchen mit 6 ml Hirn-Herz-Bouillon (BHI) mit Eisensulfit gegeben, mit einem Paraffin-Vaseline-Stopfen luftdicht verschlossen und 72 Stunden bei + 37° C bebrütet. Die Bouillon wurde vor der Beimpfung 10 Minuten gekocht, um sie vollkommen zu entgasen.

Als Wachstumskriterien für Clostridien in der BHI-Bouillon gelten die Trübung und die Schwärzung (bei sulfitreduzierenden Clostridien) des Mediums und Gasbildung. Aus jedem verdächtigen Röhrchen wurde doppelt auf Blutagar und PC-Agar ausgestrichen und aerob und anaerob 48 Stunden bei + 30°C bebrütet.

Ausschließlich anaerob gewachsene katalase-negative Kolonien wurden erneut subkultiviert und aerob und anaerob bebrütet. Reinkulturen, die nur anaerob

wuchsen, katalase-negativ waren und in der Gramfärbung als gram-positive Stäbchen erschienen, wurden als Clostridien angesehen.

#### 3.2.4.3.5 Nachweis von *Listerien*

Aus der ersten (Halb-Fraser-Bouillon) und aus der zweiten selektiven Anreicherung (Voll-Fraser-Bouillon) wurde nach 48 Stunden auf den beiden Selektivmedien Oxford- und Palcam-Agar ausgestrichen und 24 bzw. 48 Stunden bei + 37°C bebrütet.

Typische, 24 Stunden auf Oxford-Agar gewachsene Kolonien von *Listeria* spp. sind klein (1 mm), gräulich und von Schwärzungshöfen umgeben. Die nach 48 Stunden erhaltenen Kolonien sind dunkler, möglicherweise mit einem grünlichen Schimmer, etwa 2 mm im Durchmesser, mit Schwärzungshöfen und eingesunkenen Zentren.

Auf Palcam-Agar wächst *Listeria* spp. nach 24 Stunden Bebrütung in kleinen gräulich-grünen oder olivgrünen Kolonien, 1,5 mm bis 2 mm im Durchmesser, manchmal mit schwarzen Zentren, aber immer mit Schwärzungshöfen. Nach 48 Stunden erscheinen Listerien als grüne Kolonien, 1,5 mm bis 2 mm im Durchmesser, mit eingesunkenen Zentren und mit Schwärzungshöfen.

Zur Bestätigung von *Listeria* spp. wurden von jeder Platte Oxford- und Palcam-Agar fünf verdächtige Kolonien genommen, auf TSYE-Agarplatten (Trypton-Soja-Hefe-Extrakt-Agar) ausgestrichen und 24 Stunden bei + 37°C bebrütet. Typische Kolonien haben einen Durchmesser von 1 mm bis 2 mm, sind farblos, konvex, opak und haben einen vollständigen Rand. Beim Beleuchtungstest nach Henry im schrägen Durchlicht (45°) erscheinen Listerienkolonien bläulich und durchscheinend. Zur weiteren Identifizierung und Differenzierung konnten die Kolonien direkt von den TSYE-Agarplatten abgenommen werden. Folgende Untersuchungen sind nach der Methode DIN EN ISO 11290-1 als Bestätigung von *Listeria* spp. durchzuführen: Katalasetest, Gramfärbung und Beweglichkeitsprüfung.

Zeigten die untersuchten Kulturen in diesen Tests die für *Listeria* spp. typischen Reaktionen, wurden weitere Untersuchungen zur Bestätigung von *L. monocytogenes* durchgeführt. Die Kulturen wurden für die Bestätigungsreaktionen in TSYE-Bouillon

übertragen und auf eine positive Hämolyse-Reaktion, auf den Abbau von Rhamnose und Xylose, sowie auf ihr Verhalten im CAMP-Test untersucht.

### **3.2.5 Untersuchungen auf Nematoden bei Ostseezandern**

#### **3.2.5.1 Verdau der Eingeweide**

Die kompletten Eingeweide aller Fische sowie beide Bauchlappen und je ein Filet der runden Fische wurden auf Nematoden untersucht. Die Eingeweide wurden in 1 Liter eines Pepsin-HCl-Gemisches bei + 37°C durch Rühren auf einem Magnetrührgerät 1 bis 2 Stunden verdaut. Nach dem Verdau wurde die Lösung durch ein feinmaschiges Sieb gegossen. Vorhandene Nematoden verblieben unbeschädigt im Rückstand, wurden in eine gläserne Petrischale gegeben und vor einem dunklen Hintergrund ausgezählt. Bei ca. 100 Larven wurden lichtmikroskopisch in einer 20fachen Vergrößerung die morphologischen Kriterien von *Anisakis* spp. überprüft (verdickter Ventrikel ohne Blindsäcke am Ösophagus und Darm).

#### **3.2.5.2 Fluoreszenzmethode bei Fischfilets und Bauchlappen**

Die Fische wurden filetiert, die Filets und die Bauchlappen in PE-Beutel gelegt. Die Muskulatur (1 Filet und beide Bauchlappen pro Fisch) der Fische wurde mit Hilfe einer Presse zu einer ca. 2 mm dünnen Schicht gequetscht und eingefroren. Nach 2 Tagen Tiefgefrieren bei - 20°C wurden die Muskelschichten wieder aufgetaut und unter UV-Licht untersucht. Durch den Gefrierprozess werden Nematoden unter UV-Licht als blau fluoreszierende Fäden sichtbar.

### **3.2.6 Untersuchung der Filets auf flüchtige Basenstickstoffe (TVB-N)**

#### **3.2.6.1 Aufschluss der Muskelproben mit 6 %-iger Perchlorsäure (saurer Extrakt)**

Der Verderbsgrad von Fischen und Fischprodukten lässt sich in vielen Fällen anhand des Gehaltes an flüchtigen Basenstickstoff - totale volatile basic nitrogen (TVB-N) abschätzen. Der Gehalt von TVB-N wurde nach der Methode L 10.00-3 (Bestimmung des Gehaltes von flüchtigen stickstoffhaltigen Basen (TBV-N) in Fischen und

Fischerzeugnissen Referenzverfahren) der AMTLICHEN SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 35 bestimmt.

Jeweils ein Filet von insgesamt 18 leeren und 17 runden Fischen der 3. Zandergruppe wurde an den Lagerungstagen 1, 7, 11 und 14 für die Bestimmung des TVB-N-Gehaltes untersucht. Die Fischfilets wurden mechanisch in einem Grobzerkleinerungsgerät zerkleinert. 20 g der homogenisierten Masse wurde mit 180 ml einer 6 %-igen  $\text{HClO}_4$ -Lösung (Perchlorsäure) versetzt. Das Homogenisat wurde mit der Perchlorsäure 2 Minuten durch ein hochtouriges Zerkleinerungsgerät (Ultraturrax) mit einer Drehzahl von  $8000 \text{ min}^{-1}$  bis  $45\,000 \text{ min}^{-1}$  homogenisiert und extrahiert, über Filterpapier filtriert und das Filtrat anschließend eingefroren.

#### 3.2.6.2 Bestimmung des TVB-N-Gehaltes der Proben durch Wasserdampfdestillation

Die Wasserdampfdestillation zur Bestimmung des TVB-N-Gehaltes des Extraktes erfolgte in der Bundesforschungsanstalt für Fischerei in Hamburg. Die Vorschrift in der Methode L 10.00-3 lautet folgendermaßen:

"50,0 ml des Extraktes werden in eine zur Wasserdampfdestillation geeignete Apparatur gegeben. Zur späteren Kontrolle für die ausreichende Alkalisierung des Extraktes werden einige Tropfen Phenolphthalein zugegeben. Nach Zugabe von einigen Tropfen Silikon-Entschäumer werden dem Extrakt 6,5 ml Natriumhydroxid-Lösung zugesetzt, und die Wasserdampfdestillation wird sofort begonnen.

Der Wasserdampferzeuger wird so eingestellt, dass innerhalb von 10 Minuten etwa 100 ml Destillat erhalten werden. Das Destillationsauslaufrohr taucht in eine Vorlage aus 100 ml Borsäure-Lösung, der 3 bis 5 Tropfen Indikatorlösung zugesetzt wurden. Nach 10 Minuten wird die Destillation beendet, das Destillationsauslaufrohr aus der Vorlage entfernt und mit Wasser nachgespült. Die in der Vorlage aufgefangenen Amine werden durch Titration mit Salzsäure-Maßlösung von grün nach blau bestimmt." Parallel wird ein Blindversuch durchgeführt.

Auswertung:

Durch Titration der Vorlage mit Salzsäure-Maßlösung wird der TVB-N-Gehalt nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{TVB - N in mg/100g Probe} = \frac{(V1 - V0) * c * F * 2 * 100 * 14}{m}$$

Dabei sind:

$V1$  = Verbrauch Salzsäure-Maßlösung in ml bei der Untersuchungsprobe,

$V0$  = Verbrauch Salzsäure-Maßlösung in ml bei der Blindversuchsprobe,

$c$  = Stoffmengenkonzentration der Salzsäure in mol/l,

$F$  = Faktor der Salzsäure-Maßlösung,

$m$  = Einwaage der Probe in g.



## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Überblick**

Bei den sensorischen Untersuchungen (Frischegradbestimmung und Kochprobe) gingen bei jeder Fischart den Hauptversuchen mehrere Vorversuche voraus, in denen die unterschiedlichen Kriterien und Klassen entwickelt und festgelegt wurden und das Prüfpersonal geschult wurde. In einigen Durchgängen, in denen die Prüfer Begriffe für die Beschreibung des Frischegrades und für Geschmack, Geruch, Mundgefühl und Aussehen der Fischfilets sammelten und definierten, konnten fertige Schemata für den Frischegrad- und den Kochprobenvergleich von leeren und runden Fischen erarbeitet und in den Hauptversuchen herangezogen werden (siehe Sensorik-Tabellen in Kapitel 3 Material und Methoden). Das Frischegradschema wurde in Anlehnung an das EU-Qualitätsklassifizierungsschema erstellt, das Kochproben-schema in Anlehnung an ein für Kabeljau bereits bestehendes Verfahren in der BFA in Hamburg.

Für die bakteriologischen Untersuchungen wurden die Gewebe- bzw. Organteile von Haut, Rückenmuskel, Bauchlappenmuskel und Darm untersucht. Im folgenden werden die mikrobiologischen Parameter der 4 Matrices immer im Hinblick auf die Fragestellung "Unterschied ausgenommen - rund gelagerte Fische?" dargestellt.

### **4.2 Regenbogenforellen**

#### **4.2.1 Frischegradbeurteilung des gesamten Fisches und sensorische Beurteilung der Filets durch eine Kochprobe**

Über den gesamten Verderbsverlauf hinweg ließen sich zahlreiche, gut zu beobachtende Kriterien erarbeiten, die eine feine Abstufung der Beurteilung erlaubten. Das in den Vorversuchen entwickelte Frischegradschema erwies sich in der Handhabung als sehr übersichtlich, was den Vorgang der Klassifizierung von Ganzfischen erheblich erleichterte.

#### 4.2.1.1 Beurteilung des Frischegrades

Bei den Winterforellen (September - Dezember 1999) war in den ersten 7 Tagen der Frischegrad bei leeren und vollen Fischen sehr ähnlich. Ab dem 7. oder 10. Tag traten je nach Gruppe Qualitätsunterschiede auf. Die vollen Fische erreichten schon am 10. Tag die Grenze der Verkehrsfähigkeit mit BC- oder C-Qualität, die leeren Fische erst ab dem 13. Tag. Diese Qualitätsunterschiede sind vor allem auf starke Auflösungserscheinungen zurückzuführen, die in den Eingeweiden nicht ausgenommener Fische zu beobachten waren. Die lytischen Prozesse, die sich ausgehend vom Verdauungstrakt über den gesamten Bauchraum erstreckten, führten zunächst zu fleckförmigen Verfärbungen der Bauchwand in Höhe der Gallenblase und entlang des Darmkanals. Die Reißfestigkeit des Bauchfells sank ebenfalls, so dass das Bauchfell sich von der Muskulatur ablöste und es zu einer Erweichung der Bauchlappenmuskulatur kam. Das Fettgewebe in der Bauchhöhle verfärbte sich von weiß nach grau, löste sich allmählich auf und wurde teilweise flüssig. Ab dem 13. Tag hatte sich eine seröse, gelb-klares Flüssigkeit im Bauchraum gebildet, die zum Teil aus flüssigem Fett bestand. Bei einigen Fischen befanden sich die Organe in einer beginnenden Zersetzungsphase, bei anderen war die Zersetzung schon sehr weit fortgeschritten. Unmittelbar beim Eröffnen der Leibeshöhle runder Fische sprangen dann die Gräten hervor, und das Peritoneum war nicht mehr erkennbar. Am Tag 15 waren die Organe bei fast allen untersuchten Fischen völlig aufgelöst, die Bauchhöhle roch unangenehm sauer und faulig. Im Extremfall kam es sogar zu einer Auflösung der Bauchwandschichten bis auf die Haut.

Am Tage 0 hatten alle Versuchsgruppen die Klasse E mit 9 Punkten. Die Extraqualität blieb nur 1 bis 2 Tage erhalten, denn ab dem 3. Tag wurden Unterschiede sowohl zwischen den Versuchsgruppen als auch zwischen ausgenommenen und nicht ausgenommenen Fischen erkennbar. Eine ähnliche Entwicklung bei leeren und runden Fischen wiesen die Veränderungen der Schleimbeschaffenheit der Haut, die fortschreitende Trübung der Augen, ein Einsinken der Augäpfel und die Grau- und Braunfärbung der Kiemen auf, einhergehend mit einer Verdickung des Kiemenschleimes und einer Strukturauflösung der Kiemenblätter. Auch das Entstehen von sauren, fischigen oder

blumig-fruchtigen Gerüchen wurde bei zunehmender Lagerung an leeren und vollen Fischen beobachtet.

Die Abbildung 4 zeigt die Entwicklung des Frischegrades von ausgenommenen und nicht ausgenommenen Forellen der 4 Versuchsgruppen.

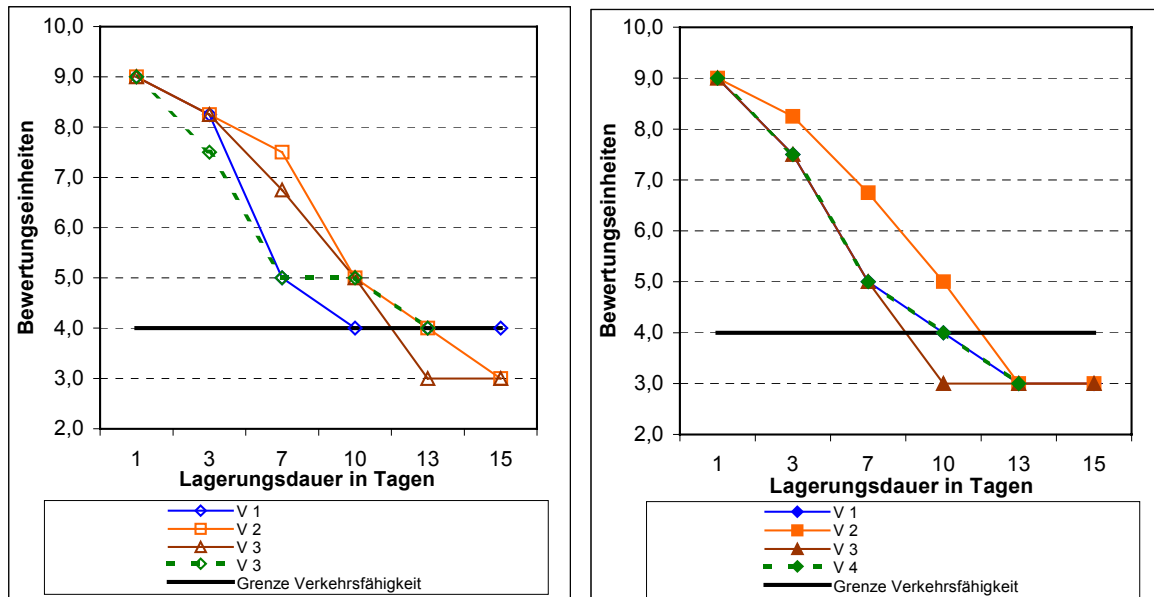


Abbildung 4: Frischegrad-Verlauf von ausgenommenen (links) und nicht ausgenommenen (rechts) Forellen, Gesamtbeurteilung (Mittelwerte) der Gruppen 1 bis 4 im Winter 1999, V = Versuch

Bei den ausgenommenen Fischen hatten alle Gruppen am Tag 3 noch die sehr gute Qualität EA oder A. Erst ab dem 7. Tag wurden die Qualitätsunterschiede stärker. Der Qualitätsabfall verlief unterschiedlich schnell. Am Tag 7 wies eine Gruppe in der Gesamtbeurteilung noch die Klasse A auf, während andere Gruppen bereits mit B beurteilt wurden. Am 10. Tag erreichte eine Gruppe schon die Grenze der Verkehrsfähigkeit, am Tag 13 erhielten alle 4 Gruppen Grenzwerte, Gruppe 3 wurde mit 3 Punkten abgelehnt. Beobachtbare Veränderungen waren v.a. die Grau- oder Gelbfärbung der Bauchlappen und die verminderte Haftung des Bauchfells an den Gräten und an der Muskulatur.

Eine ähnliche Entwicklung zeichnete sich bei den nicht ausgenommenen Fischen ab. Hier wurden schon am 10. Tag einige der Gruppen als nicht mehr verkehrsfähig und

zum Teil als verdorben beurteilt, am Tag 13 lagen alle Gruppen unterhalb der Grenze der Verkehrsfähigkeit.

In der Abbildung 5 erkennt man, dass der Frischegrad-Verlauf bei ausgenommenen Fischen günstiger einzuschätzen ist, da die Grenze der Verkehrsfähigkeit erst am 13. Tag und nicht bereits am 10. Tag unterschritten wurde. Der Abfall des Frischegrades war fast linear.

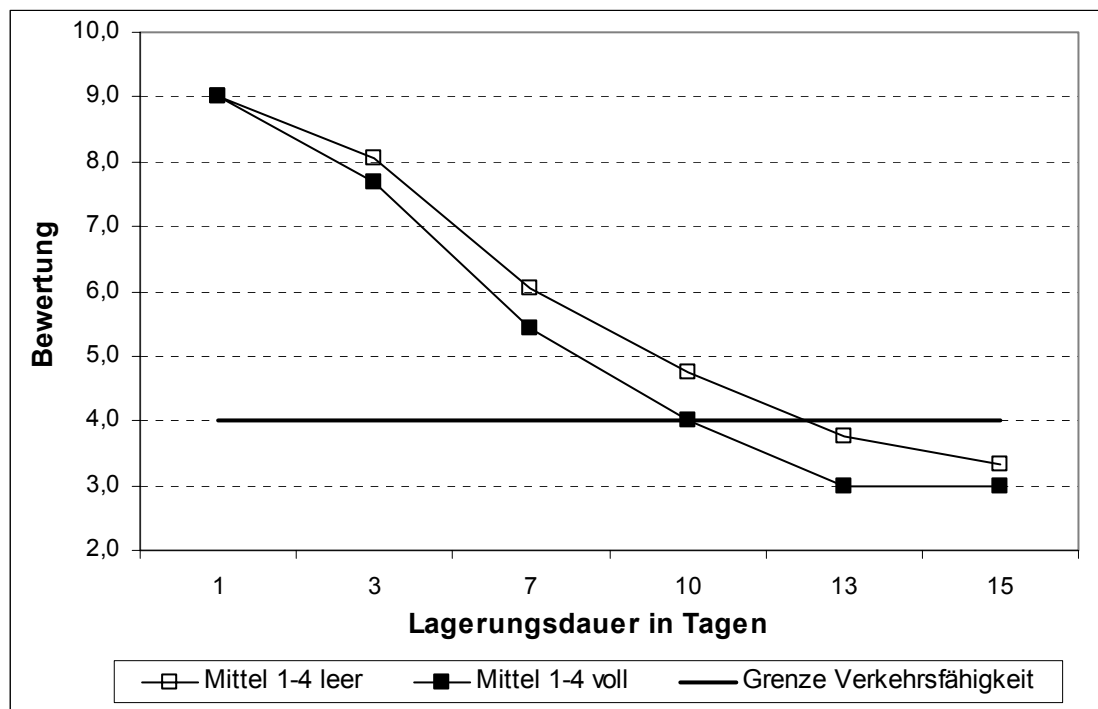


Abbildung 5: Vergleich der Entwicklung des Frischegrades bei ausgenommenen und nicht ausgenommenen Regenbogenforellen, Zusammenfassung der 4 Versuchsgruppen im Winter 1999 (Mittelwerte der Punktebewertung). Bewertung des Frischegrades: 9 = Klasse Extra; 4 = BC, Grenze der Verkehrsfähigkeit; < 4 = Klasse C, verdorben.

Von Gruppe zu Gruppe wurden die Stadien der Zersetzung unterschiedlich schnell erreicht. Bei der Gruppe 3 war die Muskulatur der Bauchinnenseite der runden Fische auf der Liegeseite bereits am 7. Tag vollständig enzymatisch zersetzt. Am 10. Tag deuteten stark eingefallene Bäuche der Fische auf eine Auflösung der Organe hin. Bei einem Fisch war am 13. Tag der Bauch bis zur Außenhaut aufgeweicht und offen ("belly burst"). Bei Gruppe 1 und Gruppe 2 wurden nur vereinzelt ab dem 10. Tag "springende Gräten" und seröse Flüssigkeit im Bauchraum beobachtet. Hier waren die Auflösungsprozesse erst ab dem 13. Tag auffällig. Bei der Gruppe 4 lösten sich die Gräten zum Teil schon ab dem 7. Tag von der Muskulatur beim Eröffnen der

Bauchhöhle, erhebliche Zersetzungerscheinungen traten aber erst am 13. Tag auf. Somit sind die inneren Kriterien wie die Beschaffenheit und Festigkeit der Bauchlappen und die Verfärbungen entlang der Gräten in der Bauchhöhle sowie der Geruch der Bauchhöhle entscheidend für die frühere Ablehnung der vollen Fische.

Bei den Herbstforellen (September - Oktober 2000) wurden drei Versuchsreihen durchgeführt, wobei die Fütterung der Forellen der Gruppen 1 und 2 ca. 7 Tage vor der Schlachtung eingestellt wurde und die Fische als nüchtern galten. Fische der Gruppe 3 erhielten 24 Stunden vor der Schlachtung noch Futter ("gefüttert").

Die Grenze der Verkehrsfähigkeit wurde von ausgenommenen Forellen, die vor der Schlachtung genüchtert worden waren, nach etwa 10 bis 11 Tagen erreicht. Der Verderbsverlauf zeigte über den beobachteten Zeitraum eine lineare Entwicklung. Im Vergleich zu den Winterforellen aus den früheren Versuchen wurde der Grenzwert etwa 2 Tage früher erreicht. Dies kann einerseits durch die im Vergleich zu den Wintertemperaturen (5 bis 9,5°C) höhere Wassertemperatur begründet sein, andererseits erfolgte eine noch strengere Bewertung der Verderbskriterien als in den Vorjahresversuchen, nachdem die Ergebnisse der Kochproben-Vorversuche eine insgesamt kürzere Haltbarkeit nahegelegt hatten.

Zu den einzelnen Bewertungskriterien wurde ein Mittelwertvergleich von leeren und runden Fischen im t-Test nach Student durchgeführt. Bei den äußerlichen Merkmalen Augen, Schleimbeschaffenheit, Kiemen und Elastizität des Rückenmuskels wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen ausgenommenen und nicht ausgenommenen Fischen festgestellt. Anhand dieser äußeren Kriterien ist eine Unterscheidung zwischen runden und leeren Fischen nicht möglich gewesen. Sichtbare Verderbsprozesse und somit Unterschiede zwischen leeren und vollen Fischen zeigten sich in der Bauchhöhle. Signifikante Unterschiede fanden sich in erster Linie bei den inneren Merkmalen in der Bauchhöhle wie der Beschaffenheit des Peritoneums, der Bauchlappenfarbe, des Bauchhöhlengeruches und somit auch bei der sich daraus ergebenden subjektiven Gesamtbewertung durch die einzelnen Prüfer.

Runde Fische wurden bereits am 4. Tag aufgrund der Verfärbungen und ersten Erweichungen der Bauchwand signifikant schlechter bewertet. Der Abstand zwischen ausgenommenen und nicht ausgenommenen Fischen vergrößerte sich in den nächsten Tagen noch, ab dem 7. Tag wurden auch deutliche Unterschiede im

Geruch der Bauchhöhle bemerkt und einige Fische als nicht mehr verkehrsfähig eingeschätzt. Danach galten alle Fische als verdorben. Im Gegensatz dazu war bei den Winterforellen auch bei runden Fischen eine etwa zwei Tage längere Haltbarkeit und ein späteres Auftreten erster Auflösungserscheinungen in der Bauchhöhle festgestellt worden.

Der Versuch mit den "gefütterten" Forellen, die 24 Stunden vor der Schlachtung noch Nahrung aufgenommen hatten, wurde nach 7 Tagen abgebrochen, weil die nicht ausgenommenen Fische in einem ekelerregenden Zustand waren. Einzelne Fische wurden bereits am 2. Lagerungstag als untauglich bewertet aufgrund einer massiven Autolyse der Bauchwand und deutlicher Geruchsabweichungen, der Gruppenmittelwert lag nur noch knapp oberhalb der Verkehrsgrenze. Ab dem 4. Lagerungstag unterschritten alle runden Fische die Verkehrsfähigkeitsgrenze. Demzufolge ergaben sich bei den unausgenommenen Fischen signifikante Unterschiede zwischen nüchternen und gefütterten Fischen bei der Gesamtbeurteilung und in der Bewertung der Bauchhöhlen-Kriterien sowie der Festigkeit der Muskulatur. Der Nüchterungsgrad kann somit ein bedeutender Einflussfaktor auf den Verderbsverlauf bei nicht ausgenommenen Fischen sein.

Zum Zeitpunkt des Versuchsabbruchs am Tag 7 erzielten ausgenommen gelagerte gefütterte Fische mit durchschnittlich 5,3 Punkten das gleiche Ergebnis wie die genüchternen Forellen, waren aber am 4. Tag insgesamt signifikant schlechter bewertet worden. Außerdem war die Muskelelastizität, wie bei den runden Fischen, am 4. und 7. Lagerungstag signifikant herabgesetzt, alle gefütterten Fische waren deutlich weicher.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch ein Ausnehmen von Forellen die Haltbarkeit um etwa 3 Tage verlängert werden kann. In der Tabelle 24 und in der Abbildung 6 ist die Frischegradbewertung bei runden und leeren gefütterten und genüchternen Forellen dargestellt.

Tabelle 24: Frischegrad-Gesamtbewertungen (= Punktebewertung) von ausgenommen und rund gelagerter Forellen aus der Kreislaufanlage des Versuchsgutes, Herbst 2000

	Tag	2	4	7	9	11
<b>nüchtern</b>	leer		6.8 +/- 0.3	5.4 +/- 0.4	4.5 +/- 0.2	3.8 +/- 0
	rund		6.1 +/- 0.2	4.0 +/- 0.7	2.3 +/- 0.4	0.9 +/- 0.1
<b>gefüttert</b>	leer	7.6 +/- 0.3	6.3 +/- 0.2	5.3 +/- 0.2		
	rund	4.5 +/- 1.0	2.0 +/- 1.3	0.3 +/- 0.3		

Bewertung: jeweils Gruppenmittelwert und Standardabweichung  
je 5 ausgenommene und runde Fische; Tag 7 und 9 Gruppe nüchtern: je 10 Fische

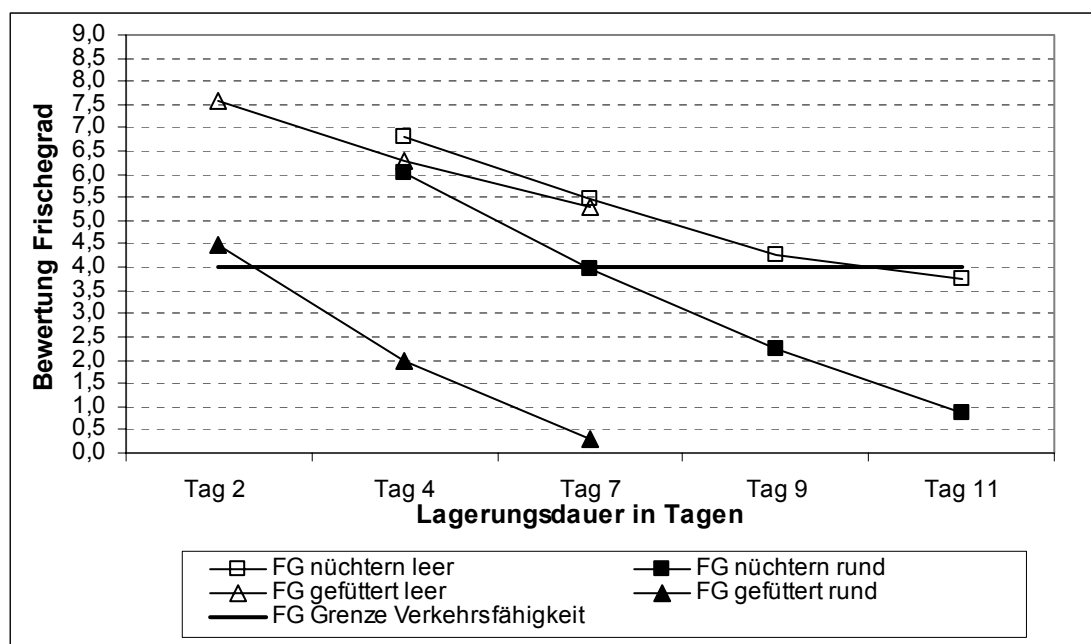


Abbildung 6: Frischegradverlauf (FG) von leeren und runden Regenbogenforellen aus der Kreislaufanlage, Herbstuntersuchungen 2000, Gruppenmittelwert, je 5 ausgenommene und runde Fische; Tag 7 und 9 nüchtern: je 10 Fische

#### 4.2.1.2 Sensorische Beurteilung der Filets durch die Kochprobe

Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse der Kochproben-Untersuchungen. Es wird deutlich, dass v.a. bei den genüchternen und ausgenommen gelagerten Forellen die Kochproben-Ergebnisse der Gesamtbewertung mit den Frischegrad-Bewertungen gut überein stimmten. Auch bei den gefütterten ausgenommenen Fischen konnte eine gute Übereinstimmung der Kochprobe mit den Ergebnissen der Frischegraduntersuchung erzielt werden. Im Gegensatz dazu fielen die

Kochprobenbeurteilungen der Filets der rund gelagerten Fische wesentlich besser aus als die dazugehörigen Frischegradergebnisse.

Tabelle 25: Gesamtbewertung (=Punktebewertung) der gekochten Filets, Forellen aus der Kreislaufanlage des Versuchsgutes, Herbst 2000

	Tag	2	4	7	9	11
<b>nüchtern</b>	leer		70.2 +/- 2.3	58.0 +/- 4.5	50.5 +/- 2.6	37.0 +/- 0.8
	rund		70.6 +/- 2.2	58.3 +/- 5.9	54.0 +/- 11.3	36.0 +/- 4.0
<b>gefüttert</b>	leer	72.0 +/- 4.9	61.0 +/- 6.3	53.0 +/- 6.1		
	rund	72.0 +/- 4.5	63.0 +/- 9.4	47.0 +/- 3.8		

Erläuterungen: siehe Tabelle 24

Die Bewertung durch die einzelnen Prüfer war sehr unterschiedlich, was durch die verhältnismäßig großen Standardabweichungen bei den Gesamtmittelwerten in Tabelle 25 erkennbar ist. Grund hierfür könnten ungleiche subjektive Bewertungen einzelner Komponenten als auch geringgradige Geruchs- und Geschmacksabweichungen sein, die nicht alle Prüfer gleichermaßen wahrgenommen haben. Vergleicht man die Gruppenbewertungen durch den einzelnen Prüfer, so können in keinem der vier Kriterien (Geruch, Geschmack, Aussehen oder Textur) Unterschiede zwischen runden und ausgenommenen Fischen festgestellt werden. Auch die Schlechterbewertung der gefütterten runden Fische am 7. Lagerungstag im Vergleich zu den ausgenommenen Fischen war nicht signifikant. In der Kochprobe der Filets ergaben sich daher keine signifikanten Unterschiede zwischen ausgenommenen und runden Fischen.

Vergleicht man gefütterte und genüchterte Fische, so erkennt man, dass Geruch, Geschmack und Textur der Filets gefütterter Fische schlechter bewertet wurden als bei genüchternen, so dass es zum Teil zu signifikanten Unterschieden am 4. und 7. Lagerungstag kam. Bemängelt wurde bei den Filets sowohl runder als auch ausgenommener gefütterter Fische am 7. Tag vor allem ein unangenehmer Geruch nach Fischfutter. Abbildung 7 zeigt die Gesamtbewertung der Filets durch die Kochprobe.



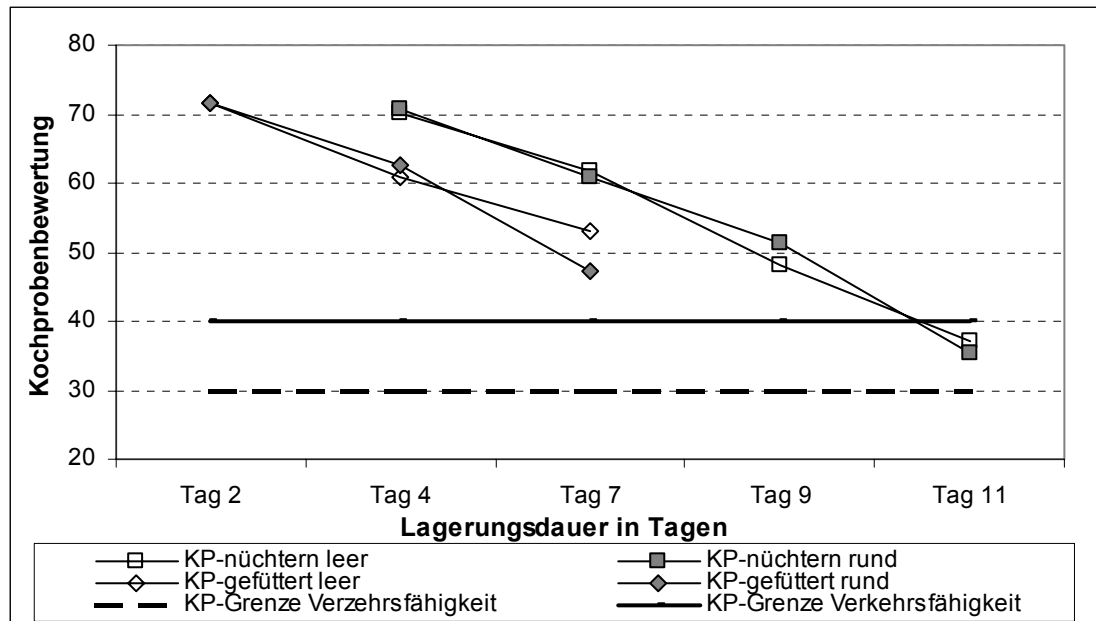


Abbildung 7: Sensorische Kochproben-Bewertung (KP) der Regenbogenforellen-Filets aus der Kreislaufanlage, Herbstuntersuchungen 2000 (Versuche 1 bis 3) jeweils Mittelwerte, nüchterne (N = 30 leer, 30 rund), gefütterte (N = 15 leer, 15 rund) Fische

Aufgrund massiver Veränderungen in der Bauchhöhle wurden nach den vorliegenden Ergebnissen genüchterte, runde Fische bei der Frischegradbewertung etwa drei Tage vor den ausgenommenen als nicht mehr verkehrsfähig eingestuft. Bei der Beurteilung der sensorischen Qualität durch eine Kochprobe wurde dieser Zusammenhang jedoch bei dem gewählten Stichprobenumfang nicht festgestellt.

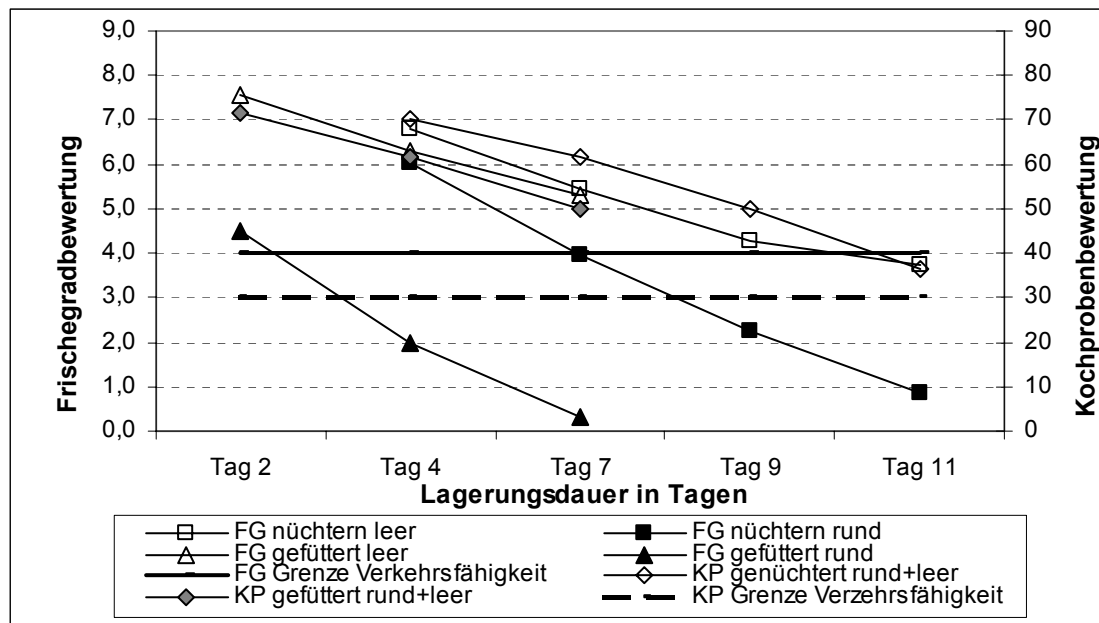


Abbildung 8: Frischegradverlauf (FG) und Kochproben-Untersuchung (KP) von Regenbogenforellen-Filets aus der Kreislaufanlage, Herbstuntersuchungen 2000; jeweils Mittelwerte, nüchterne (N = 30 leer, 30 rund), gefütterte (N = 15 leer, 15 rund), KP rund und leer zusammengefasst da nicht verschieden

#### 4.2.2 Mikrobiologische Bewertung der Haut, der Rückenmuskulatur, des Darmes und der Bauchlappenmuskulatur

Im Sommer 2001 (Juni - August) wurde im Vergleich zu den im Winter 1999 durchgeführten Lagerungsversuchen mit Forellen derselben Anlage ein Keimstatus der äußerlichen Belastung ermittelt. Ebenso wurden der Darm und die Bauchhöhle ausgenommener und unausgenommener Fische untersucht. Durch die beobachtete Autolyse des Darmes schien eine stärkere Kontamination der Bauchhöhle durch einen Übertritt von Darmbakterien bei runden Fischen wahrscheinlich, so dass sich ein erhöhtes Risiko für den Verbraucher ergeben kann. Weiterhin sollte die Frage untersucht werden, inwieweit die Hygiene-Bedingungen beim Ausnehmen der Fische eine Rolle bei der bakteriellen Belastung der Bauchhöhle spielen. Als „worst-case-Szenario“ wurde Wasser aus dem Fischbecken zum Waschen verwendet. Dies widerspricht den Anforderungen der Fischhygiene-Verordnung, ist aber nicht unüblich in der Praxis kleiner Betriebe mit Ab-Hof-Abgabe. Das Untersuchungsspektrum umfasste im ersten der drei Durchgänge im Sommer 2001

die Verderbsparameter aerobe Gesamtkeimzahl (GKZ), Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae* sowie die humanpathogenen Keime Salmonellen und Listerien.

#### 4.2.2.1 Verderbniserreger

Aufgrund der methodisch bedingten Nachweis- und Quantifizierungsgrenze sind in den Tabellen im Anhang (Tabelle A E-1 bis A E-15) keine Einzelwerte der Ergebnisse der Keimzahlbestimmung zwischen log 2,3 und log 3 KbE/g oder cm<sup>2</sup> beim Tropfplattenverfahren, bzw. log 2,0 und log 3,3 KbE/g oder cm<sup>2</sup> beim Spatelplattenverfahren aufgeführt. Bei fehlendem Wachstum wurde zur graphischen Darstellung und zur rechnerischen Verarbeitung der Daten der Wert der Nachweisgrenzen (log 2,3 bzw. 2,0 KbE/g oder cm<sup>2</sup>) eingesetzt.

#### Keimbelastung auf der Haut ausgenommener und unausgenommener Fische

Eine Untersuchung der Keimbelastung auf der Haut erfolgte in allen 4 Durchgängen der Winterversuche und beim ersten Durchgang der drei Sommerversuche. Die Entwicklung im Sommer und im Winter wird im folgenden tendenziell beschrieben und nicht statistisch verglichen, da der Stichprobenumfang im Winter 1999 mit 4 Versuchsdurchgängen bei insgesamt 20 Fischen pro Untersuchungstag lag, in Sommer hingegen nur bei 5 Fischen pro Untersuchungstag. Am Tage 0, d.h. einige Stunden nach dem Fang und der Tötung der Fische, betrug die GKZ bei den Winterfischen auf der Haut log 3,73 +/- 0,46 KbE/cm<sup>2</sup>. Dabei traten von Gruppe zu Gruppe starke Schwankungen auf (log 3,0 bis 4,7 KbE/cm<sup>2</sup>). Bis zum 7. Tag blieb die GKZ unverändert oder sank leicht ab. Dieser Abwärtstrend ließ sich bei fast allen Versuchsdurchgängen beobachten. Zwischen Tag 7 und 10 fand eine starke Vermehrung um ein bis zwei Zehnerpotenzen statt. Bis zum Ende der Lagerzeit nach 2 Wochen erreichten die Keimzahlen Werte zwischen log 6 und log 7 KbE/cm<sup>2</sup>. Vereinzelt ließen sich auf einigen Hautproben auch Kolonien bis 10<sup>8</sup> KbE/cm<sup>2</sup> zählen. Die äußerliche Keimbelastung bei den leeren Fischen unterschied sich an keinem Untersuchungstag signifikant von der bei runden.

Ähnlich hoch waren bei den Sommerforellen zu Beginn der Lagerung die Keimzahlen auf der Haut bei den runden Fischen mit log 3,52 +/- 0,34 KbE/cm<sup>2</sup>, bei den leeren Fischen mit log 3,75 +/- 0,25 KbE/cm<sup>2</sup>. Bis zum Tag 7 blieben die Keimzahlen auf der Haut leerer und voller Fische nahezu auf dem gleichen Niveau, ab Tag 11 stiegen sie

bei leeren Fischen stärker an und lagen um eine Zehnerpotenz höher als auf der Haut voller Fische. Gegen Ende der Lagerung am Tag 13 wuchsen die Keimzahlen auf  $\log 6,61 \pm 0,26$  bei vollen und  $\log 7,55 \pm 0,29$  KbE/cm<sup>2</sup> bei leeren Fischen an. Sowohl der Anfangskeimgehalt als auch der Verlauf der Keimzahlen auf der Haut ist bei Winter- und Sommerfischen aus derselben Forellenanlage gut vergleichbar. Bei den „Sommerforellen“ kam es aber trotz optimaler Lagerung nach der Lag-Phase zu einem schnelleren Keimwachstum, so dass die Gesamtkeimzahl ab dem 7. Lagerungstag 1,5 Zehnerpotenzen über den Winter-Ergebnissen lag.

Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass die Keimbelastung auf der Haut von Forellen der untersuchten Anlage vom Zeitpunkt des Fanges bis zum Tag 7 auf nahezu gleichem Niveau um  $\log 3$  bis  $4$  KbE/cm<sup>2</sup> blieb, und es erst danach zu einem Anstieg der Keimzahlen kam. Bis zum Lagerungsende am Tag 13 bzw. 15 wurden Keimzahlen um  $\log 7$  KbE/cm<sup>2</sup> erreicht, im Sommer trat dieser Anstieg einige Tage früher auf. Der jahreszeitliche Einfluss kann nach den beschriebenen Ergebnissen von Bedeutung sein, war aber hier nicht Versuchsgegenstand. Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse der Gesamtkeimzahlen gegen Lagerungsende auf der Haut von Forellen in den Winter- und Sommeruntersuchungen.

Tabelle 26: Vergleich der Gesamtkeimzahlen auf der Haut von Forellen, Versuch im Winter 1999 und im Sommer 2001; Mittelwerte und Standardabweichungen

Haut rund/leer	Tag 10/11	Tag 12/13	Tag 14/15
Winter V 1 rund	4,62 +/- 0,65	5,13 +/- 0,47	6,30 +/- 0,38
Winter V 1 leer	5,21 +/- 0,13	5,91 +/- 0,28	6,65 +/- 0,32
Winter V 2 rund	3,99 +/- 0,67	4,07 +/- 0,72	5,94 +/- 0,72
Winter V 2 leer	4,27 +/- 1,10	5,52 +/- 1,11	6,60 +/- 0,65
Winter V 3 rund	6,52 +/- 0,41	7,38 +/- 0,49	8,02 +/- 0,37
Winter V 3 leer	6,70 +/- 0,92	7,04 +/- 0,89	7,79 +/- 0,28
Winter V 4 rund	5,70 +/- 1,52	6,95 +/- 0,13	n.u.
Winter V 4 leer	5,30 +/- 0,43	6,14 +/- 0,78	n.u.
Sommer V 1 rund	5,78 +/- 0,55	6,61 +/- 0,26	n.u.
Sommer V 1 leer	6,96 +/- 0,39	7,55 +/- 0,29	n.u.
Mittelwert Winter rund/leer	5,25 +/- 1,25	6,00 +/- 1,28	6,89 +/- 0,89
Mittelwert Sommer rund/leer	6,37 +/- 0,77	7,08 +/- 0,56	n.u.

Keimzahlen in  $\log$  KbE/cm<sup>2</sup>, V = Versuch; leer = ausgenommen, rund = unausgenommen; n = 5 pro Gruppe und Tag; n.u. = nicht untersucht

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der 4 Gruppen der Winterversuche zusammengefasst und dem Keimzahlverlauf im Sommer gegenübergestellt.

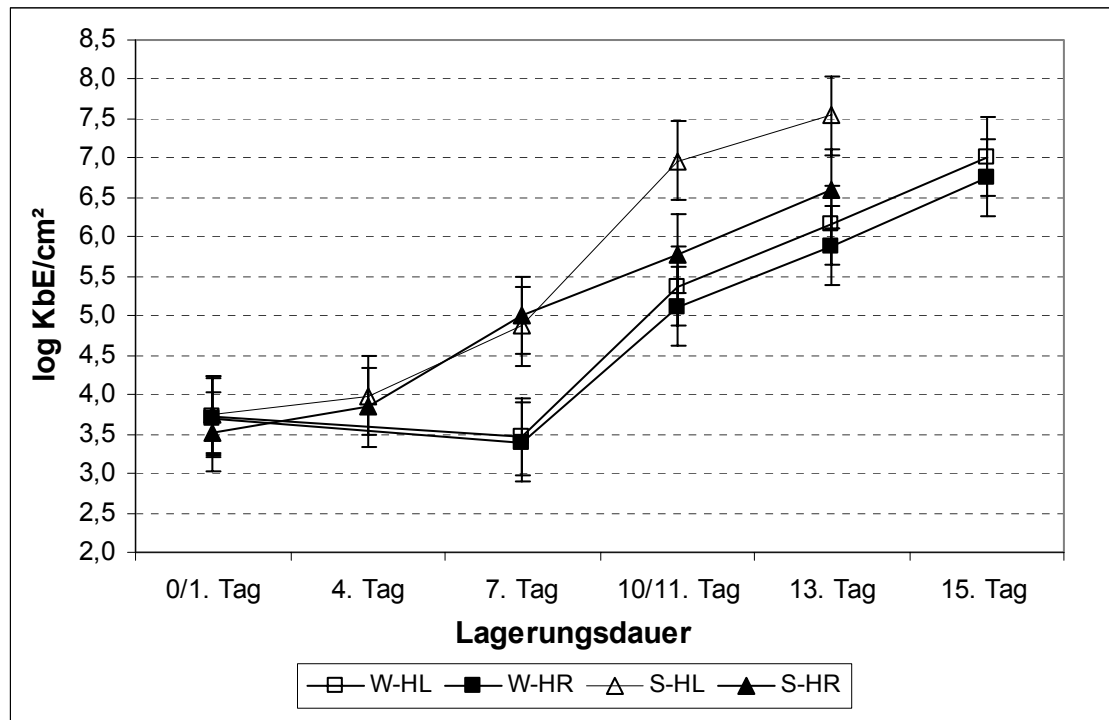


Abbildung 9: Vergleich des aeroben Gesamtkeimzahlverlaufes auf der Haut von ausgenommenen und nicht ausgenommenen Forellen im Winter 1999 (20 leere und 20 runde Fische pro Tag) und im Sommer 2001 (5 leere und 5 runde Fische pro Tag), W = Winter; S = Sommer; HL = Haut leer; HR = Haut rund

Die dominierenden Verderbnisorganismen in der Fischkeimflora bei den Forellenuntersuchungen waren die Pseudomonaden. Ihre Entwicklung verlief parallel zum Verlauf der GKZ. Bei den Hautproben der Winterfische waren in den ersten Tagen die Werte für die Gesamtkeimbelastung etwas höher als der Gehalt an Pseudomonaden, aber ab dem 7. Lagerungstag waren die GKZ und *Pseudomonas*-Keimzahlen nahezu auf dem gleichen Niveau, wie Abbildung 10 zeigt. Zwischen leeren und runden Fischen bestand fast kein Unterschied in der Entwicklung der *Pseudomonas*-Keimzahl auf der Haut. Auffallend ist, dass die Keimzahlen zwischen Tag 0 und Tag 7 nicht wie beim Verlauf der GKZ sanken, sondern gleich blieben oder leicht anstiegen.

Im Sommer 2001 wurde nur im ersten der drei Durchgänge ein Pseudomonaden-Nachweis durchgeführt. Auf der Haut und auch in den Bauchlappen der ausgenommenen Fische wurden am Tag 1 Werte um die Quantifizierungsgrenze von  $\log 3,3 \text{ KbE/g und cm}^2$  erreicht, diese stiegen bis zum Ende der Lagerung auf  $\log 5,9$

bis 6,7 KbE/g und  $\text{cm}^2$  an. Damit lagen die Werte um ca. eine Zehnerpotenz niedriger als die Gesamtkeimzahlen.

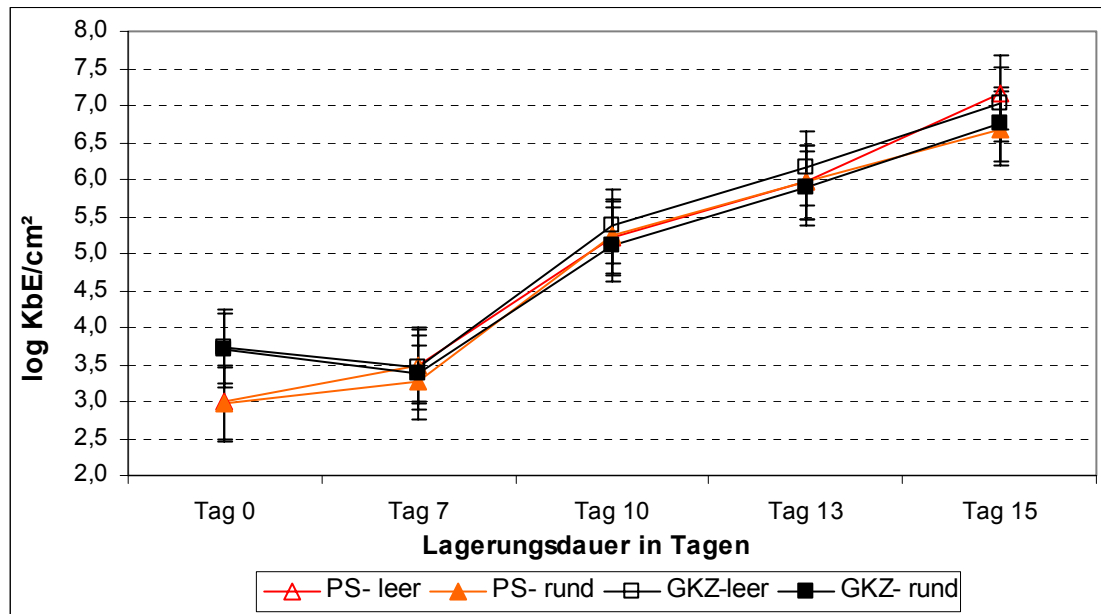


Abbildung 10: Vergleich aerobe Gesamtkeimzahl (GKZ) und Pseudomonaden-Keimzahl (PS) auf der Haut von Forellen, Winterversuche 1999; Mittelwert aller 4 Gruppen; n = 20

#### Keimbelastung in der Muskulatur:

Im Winter 1999 wurden Rückenmuskelproben aus dem Filet untersucht, im Sommer 2001 entstammten die Muskelproben aus dem Bauchlappen.

Die Rückenmuskelproben der Winterfische zeigten im Hinblick auf die mikrobiologische Kontamination keine Unterschiede zwischen leeren und runden Fischen. Sie alle waren im Verderbsverlauf erst sehr spät und nur in geringem Ausmaß bakteriell besiedelt. Die Keimzahlen bewegten sich bis zum 7. Tag knapp unter- bzw. oberhalb der Quantifizierungsgrenze von 3,0 KbE/g, erst ab dem 10. Lagerungstag wurden höherer Werte ab log 4 KbE/g nachgewiesen. Im Muskel leerer Fische wurden am Ende der Lagerung *Pseudomonas*-Gehalte von log 4,77 bis log 6,38 KbE/g erreicht, bei Versuch 3 sogar log 7,96 KbE/g.

Da neben den Rückenfilets auch die Bauchlappen zum verzehrsfähigen Anteil bei Forellen zählen, wurde bei den Sommerfischen eine Untersuchung der Bauchlappenmuskulatur ausgenommener Fische durchgeführt. Ein Vergleich von "schlechter" Schlachthygiene (Waschen mit Beckenwasser) in Versuch 1 und "guter"

(Waschen mit Trinkwasser) in Versuch 3 bot einen Rückschluss auf den Einfluss von Hygiene auf die Keimbelastung der Forellen. Beim ersten Durchgang fanden sich nach dem Ausnehmen und Waschen der Tiere in der Bauchlappenmuskulatur der leeren Fische ähnlich hohe GKZ wie auf der Haut. Die GKZ war mit  $\log 4,77 \text{ KbE/g}$  zu Beginn der Untersuchung im Vergleich zur GKZ auf der Haut etwas höher und stieg dann kontinuierlich bis zum 13. Tag der Lagerung auf  $\log 6,49 \text{ KbE/g}$ . Der Eintrag von Keimen durch das Handling war demnach höher als die natürliche äußerliche Keimflora der Fische.

Im Gegensatz dazu wurden beim dritten Durchgang im Sommer 2001 die Fische nach dem Ausnehmen im Institut unter Leitungswasser gewaschen, welches bei einer bakteriologischen Untersuchung  $< 100 \text{ Keime/ml}$ , d.h. mit der angewandten Methode kein Keimwachstum aufwies. Aus diesem Grunde war die Kontamination der Bauchlappen leerer Fische beim Waschen sehr gering. Direkt nach dem Ausnehmen und Auswaschen der Bauchhöhle war am Tag 0 nur 1 von 10 Proben mit Bakterien besiedelt (Nachweisgrenze  $\log 2 \text{ KbE/g}$ ), d.h. 10 % der Proben waren positiv. Am Tag 3 waren 20 % der Proben positiv, am 6. Tag 30 %, wobei keine Werte oberhalb der Quantifizierungsgrenze von  $\log 3,3 \text{ KbE/g}$  erreicht wurden. Erst ab dem 9. Tag der Lagerung waren 100 % der Proben mit Bakterien kontaminiert, bei 80 % der Proben lagen die Keimzahlen oberhalb der Quantifizierungsgrenze ( $\log 3,3 \text{ KbE/g}$ ). Es wurde in den beiden Durchgängen deutlich, dass die mikrobiologische Qualität des zum Auswaschen der Fische nach dem Ausnehmen verwendeten Wassers ausschlaggebend sein kann für die bakterielle Belastung der Bauchhöhle und der Entwicklung der Keime während der Lagerung. Ein Waschen der Fische mit Leitungswasser anstelle von Oberflächenwasser aus der Anlage ist in jedem Fall wünschenswert.

Bei den runden Fischen ergab sich ein anderes Bild, die Bauchlappen blieben in allen drei Durchgängen in der ersten Woche, zum Teil auch bis zum Lagerungsende, nahezu steril. Tabelle 27 zeigt, dass beim ersten Durchgang an den Tagen 1 und 4 die Keimzahlen von jeweils 4 der 5 Proben unterhalb der Nachweisgrenze von  $\log 2,0 \text{ KbE/g}$  lagen, am Tag 7 noch von 3 Proben. Am Tag 11 und Tag 13 lag die GKZ aller 5 Proben oberhalb der Nachweisgrenze, 2 bzw. 3 der Proben hatten Keimzahlen oberhalb der Quantifizierungsgrenze von  $\log 3,3 \text{ KbE/g}$ . Die Keimzahlen in der Bauchlappenmuskulatur runder Fische waren während des gesamten

Lagerungszeitraumes signifikant niedriger als die bei ausgenommenen, selbst bei guter Schlachthygiene.

Tabelle 27: Sommerversuch 1. Durchgang; GKZ im Bauchlappen runder Fische, Anzahl positiver Fische kleiner als Nachweis- bzw. Quantifizierungsgrenze

Lagerung	< Nachweisgrenze log 2,0 KbE/g	< Quantifizierungsgrenze zwischen log 2,0 und < log 3,3 KbE/g	> Quantifizierungsgrenze log 3,3, KbE/g	Mittelwert log KbE/g
<b>Tag 1</b>	4 von 5	1 von 5	0 von 5	2,26
<b>Tag 4</b>	4 von 5	1 von 5	0 von 5	2,26
<b>Tag 7</b>	3 von 5	2 von 5	0 von 5	2,52
<b>Tag 11</b>	0 von 5	2 von 5	3 von 5	3,98
<b>Tag 13</b>	0 von 5	3 von 5	2 von 5	3,60

Beim zweiten Durchgang der Sommerforellen wurden alle Fische als Rundfische gelagert, es erfolgte neben der Untersuchung des Darmes auch die der Bauchlappen. Ab welchem Zeitpunkt Keime in die Bauchlappenmuskulatur übertreten, war anhand der ermittelten Ergebnisse nicht eindeutig festzustellen. Am Tag 0 waren auf 3 der 10 Bauchlappen (BL) Keime nachweisbar, am Tag 1 hingegen bei keiner der Proben. An den folgenden Tagen waren entweder keiner oder nur einer von 10 BL positiv, erst an den Tagen 7 und 8 erhöhte sich die Anzahl positiver BL auf 3 bzw. 4 von 10, d.h. 30 bzw. 40 % der BL-Proben waren nach einer Woche Lagerung nicht mehr steril. Die Keimzahlen lagen jedoch unterhalb der Quantifizierungsgrenze von log 3,3 KbE/g. Eine Weiterführung der Lagerung, die eventuell zu einem weiteren Anstieg der Keimzahlen geführt hätte, war in diesem Fall nicht möglich, da die Auflösung der Eingeweide bereits nach 6 Tagen sehr weit fortgeschritten war. Die Muskulatur der Bauchlappen war zu diesem Zeitpunkt fast flüssig, die Probenahme dementsprechend schwierig.

Beim dritten Durchgang wurde die Keimzahl in der Bauchlappenmuskulatur runder Fische aufgrund der Ergebnisse vorheriger Untersuchungen und aufgrund der zu erwartenden niedrigen Keimzahlen unter Anwendung der 5-tube-MPN-Methode (Nachweisgrenze log 1,6 KbE/g) ermittelt. Am Tag des Fangs waren alle Bauchlappen steril, am 3. Tag der Lagerung sank der Anteil steriler Proben auf 70 %, d.h. auf drei der 10 Proben ließen sich Keime nachweisen. Die Keimzahlen lagen



dabei mit log 1,9 und 2,4 KbE/g nur knapp über der Nachweisgrenze. Am 6. Tag war wiederum nur eine Probe, d.h. 10 % der Proben kontaminiert, am Tag 9 waren es 60 %. Somit waren auch bei dieser Untersuchung die Bauchlappen der runden Fische insgesamt weniger belastet als die der von Anfang an ausgenommenen.

#### Keimbelastung im Darm von unausgenommenen Fischen

Die Untersuchung der Darmflora wurde bei den Sommerforellen im Hinblick auf einen möglichen Übertritt von Keimen in die Bauchhöhle durchgeführt. Dabei spielten unterschiedliche Fütterungsverhältnisse vor der Schlachtung eine entscheidende Rolle.

In erster Linie wurde die Entwicklung der aeroben GKZ untersucht, eine Unterscheidung zur anaeroben Keimzahl wurde nicht durchgeführt. Abbildung 11 zeigt die Gesamtkeimzahlverläufe in den 3 Untersuchungsgängen in einer Boxplotdarstellung. Bei einem Boxplot haben 50 % der Proben Werte innerhalb der Box. Die Länge der Box ist der Abstand zwischen dem 25. und dem 75. Perzentil und visualisiert den Streubereich dieser Werte. Der Strich innerhalb der Box ist der Median. Der waagerechte Strich auf einem senkrechten Strich kennzeichnet den kleinsten und größten beobachteten Wert. Werte, die mehr als das dreifache der Boxlänge über dem 75. Perzentil liegen, gelten als Extremwerte (\*), solche die mehr als das 1,5fache über dem 75. Perzentil liegen, als Ausreißer (°). Bei einem Vergleich der Abbildung mit den Daten aus den Ergebnistabellen (Anhang Tabelle A E 14) muss der Unterschied zwischen dem Mittelwert in den Tabellen und dem Median in der Abbildung 11 berücksichtigt werden.

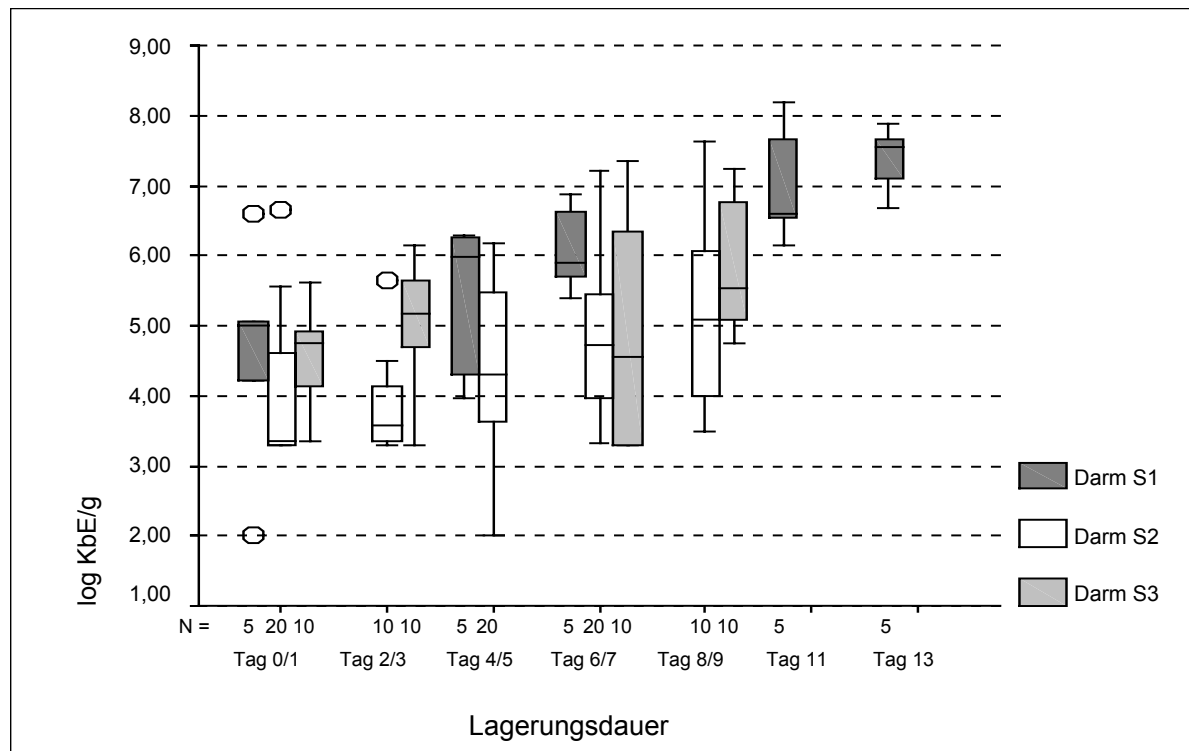


Abbildung 11: Verlauf der aeroben Gesamtkeimzahlen im Darm, Versuche 1 bis 3 Sommer 2001; N = Anzahl der Darmproben pro Stichprobe 5, 10 oder 20; S = Sommer; ○ = Ausreißer

Bei einer durchschnittlichen aeroben Ausgangskeimzahl von ca. log 4,2 KbE/g erfuhren die Keimzahlen in allen drei Durchgängen einen kontinuierlichen Anstieg auf log 5 bis 6 KbE/g nach einer Woche Lagerung und auf log 7,4 KbE/g nach 2 Wochen Lagerung (erster Durchgang). Im Vergleich mit den Ergebnissen des ersten Durchganges mit nüchternen Forellen lag die bakterielle Belastung im Darm der gefütterten Fische des zweiten Durchganges stets eine halbe bis eine ganze Zehnerpotenz unter den Werten bei nüchternen Fischen. Hier kam es in den ersten 2 Tagen der Lagerung zu einer Senkung der Werte, sie stiegen ab dem 4. Tag allmählich wieder an. Die Füllung des Darmes bewirkte somit keine erhöhte Keimbelastung. Im Gegenteil - leere Därme (erster Durchgang) hatten einen höheren Keimgehalt als volle (zweiter Durchgang). Innerhalb einer Stichprobe wurden sehr unterschiedliche Einzelergebnisse beobachtet, z.B. wurden am Tag 8 des 2. Versuches in einer Stichprobe von 10 Därmen Keimzahlen von log 3,7 bis log 7,6 KbE/g erreicht. Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Der Keimzahlgehalt des Futters betrug in etwa  $10^4$  KbE/g, was der Anfangskeimbelastung der Därme der gefütterten Gruppe 2 entspricht.

Die Ergebnisse des dritten Durchgangs mit z.T. gefüllten Därmen sind mit denen des zweiten Durchganges sehr gut vergleichbar, der Anstieg der Keimzahlen verlief von  $\log 4,54 \text{ KbE/g}$  am Tag 0 auf  $\log 5,8 \text{ KbE/g}$  am Tag 9 relativ gemäßigt und nicht so steil wie beim ersten Versuch. Während der Lagerzeit stieg die GKZ im Mittel nur um anderthalb Zehnerpotenzen an. Allerdings war auch hier die Streubreite innerhalb eines Versuchstages groß, am Tag 6 wiesen die Därme Einzelwerte von  $\log 3,3$  bis  $\log 7,34 \text{ KbE/g}$  auf.

Eine Bestimmung von Pseudomonaden im Darm erwies sich als sehr ungenau, da eine starke Begleitflora aus kleinen und großen gelben Kolonien das Wachstum der Pseudomonaden behinderte.

Werden die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung im Darm und auf den Bauchlappen runder Fische verglichen, so ergibt sich ein Zusammenhang, der in der Abbildung 12 dargestellt ist.

Beim ersten Durchgang der „Sommerforellen“-Untersuchungen zeigte sich, dass mit ansteigenden Keimzahlen im Darm durch einen möglichen Übertritt der Keime nach einer bestimmten Lagerungszeit auch die Keimzahlen in der Bauchlappenmuskulatur runder Fische ansteigen können. Hohe Keimzahlen im Darm haben aber nur selten auch hohe Keimzahlen in der Bauchhöhle zur Folge. Vergleicht man die Ergebnisse der GKZ von Darm und Bauchlappen einzelner Fische, so lassen sich bei einer GKZ im Darm von  $> \log 6,3 \text{ KbE/g}$  auch auf dem Bauchlappengewebe nachweisbare Keimzahlen feststellen (Vergleich Tabelle A E-11 und A E-12 im Anhang). So war bereits am ersten Tag der Lagerung die Bauchlappenmuskulatur eines vollen Fisches nicht frei von Keimen, und im Darm dieses Fisches fanden sich im Vergleich zu den anderen Därmen sehr hohe Keimzahlen von  $\log 6,6 \text{ KbE/g}$ . Ebenso verhielt es sich am Tag 4. Eine Keimbelastung auf den Bauchlappen kann demnach auch von der Keimdichte des Darmes abhängig sein. Trotzdem kam es insgesamt zu keiner starken Vermehrung auf den Bauchlappenproben, auf denen die Keime während der gesamten Lagerung unterhalb der Quantifizierungsgrenze von  $\log 3,3 \text{ KbE/g}$  blieben, auch wenn die Eingeweide der rund gelagerten Fische des zweiten Versuches bereits nach vier Tagen Auflösungserscheinungen zeigten und die Muskulatur Verfärbungen und ausgedehnte Erweichungen aufwies.

In allen 3 Durchgängen wurde deutlich, dass trotz weit fortgeschrittener Autolyse des Magen-Darm-Traktes und einer damit einhergehenden Auflösung der Organe die

Bauchlappen im ungeöffneten Fisch zum größten Teil steril blieben. Die aerobe Keimbelastung der Bauchlappen lag meist 3 bis 5 Zehnerpotenzen unter den jeweiligen Darmkeimzahlen, sofern überhaupt eine Besiedlung feststellbar war. Autolytische Vorgänge haben demnach keine verstärkte mikrobiologische Verderbsentwicklung zur Folge.

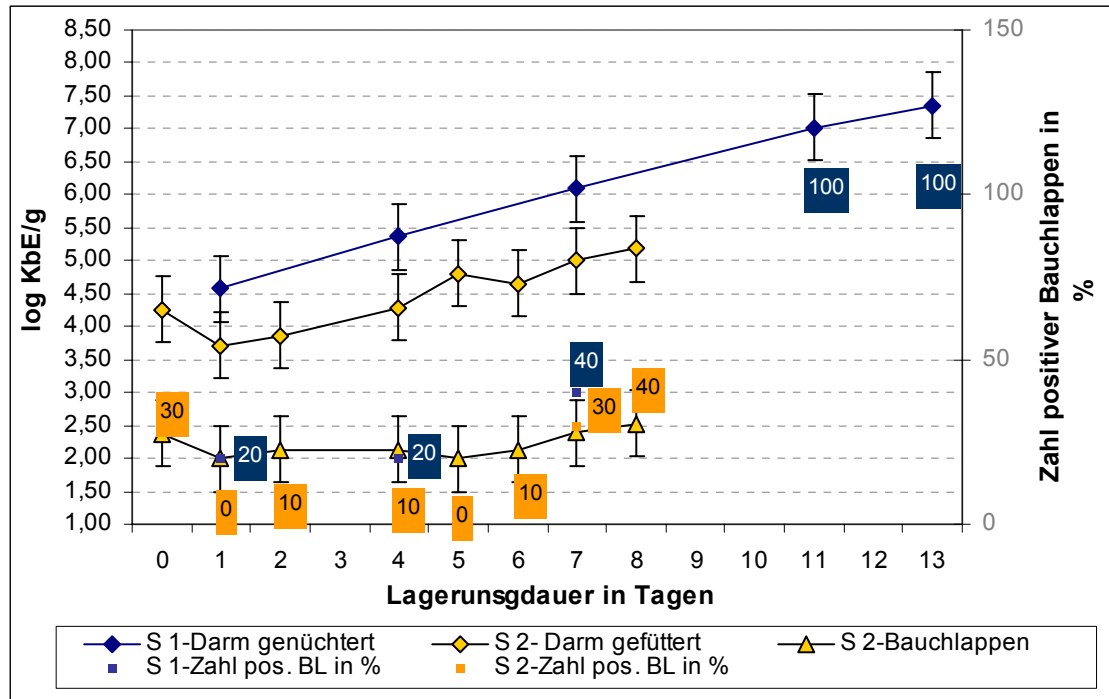


Abbildung 12: Aerobe Gesamtkeimzahl im Darm und im Bauchlappen von gefütterten und genücherten runden Forellen, 2001 Sommerversuche 1 und 2, Anteil positiver Bauchlappenproben in Prozent; S = Sommer, BL = Bauchlappen,  $n_{1(\text{Versuch } 1)} = 5$ ,  $n_{2(\text{Versuch } 2)} = 10$

#### 4.2.2.2 Humanpathogene und Indikatorkeime

Humanpathogene Keime bzw. Indikatorkeime wurden nur vereinzelt in Forellengewebe nachgewiesen. Dabei traten bei der Untersuchung auf *Enterobacteriaceae* und *Aeromonas* spp. Schwierigkeiten auf, da sich die herangezogenen Methoden für die Fischmatrizes als ungeeignet herausstellten. Auf der Haut, in der Rücken- und Bauchlappenmuskulatur und im Darm von Winter- und Sommerforellen ließen sich in unterschiedlichen Mengen *Enterobacteriaceae*, *Aeromonaden* und *Listerien* nachweisen. Der Salmonellen- und der Clostridiennachweis fielen negativ aus.

Die Erfassung von *Enterobacteriaceae* erwies sich in allen Untersuchungen als schwierig und nicht eindeutig. Laut der angewandten Methoden L 06.00-24 und -25 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG und der ISO/FDIS 5552 1997-Methode mit MPN werden alle Kolonien, die auf VRBG-Agar als rote oder rosa Kolonien mit oder ohne Präzipitationshöfe wachsen, als *Enterobacteriaceae* angesehen. In der § 35-Methode reicht ein typisches Wachstum der Keime auf VRBG-Agar zur Identifizierung aus. Es wird sogar ausdrücklich darauf hingewiesen, dass bei anaerober Bebrütung "unter Verzicht auf Subkultivierung und Oxidasetest alle Kolonien als *Enterobacteriaceae* ausgezählt [werden]". Nach der MPN-Methode müssen die Keime darüber hinaus oxidase-negativ sein und Glucose fermentieren. Da bei allen Untersuchungen auf VRBG-Agar eine große Anzahl an unterschiedlichen und vorwiegend oxidase-positiven Kolonien gewachsen ist, scheint dieses Medium bei Proben aus Fisch wenig selektiv für *Enterobacteriaceae* zu sein. In die Auswertung gingen in Anlehnung an die § 35-Methode dennoch alle zählbaren Kolonien mit ein. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Morphologie und Erscheinungsformen von auf VRBG-Agar gewachsenen Keimen und daraus folgenden Quantifizierungsproblemen und der gefundenen niedrigen Keimzahlen, erscheint es sinnvoller, anstatt eines Mittelwertvergleiches die Anzahl der *Enterobacteriaceae*-positiven Fische wie in Tabelle 28 anzugeben.

Tabelle 28: Anzahl Enterobacteriaceae-positiver Haut- und Muskelproben von Forellen, Winter- und Sommersversuche, n=5

Tag		1		4		7		10/11		13		15	
Gewebe		M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H
W 1	L			n.u.	n.u.	2		3	5	5 (1)	5 (1)	5 (4)	5 (5)
	R			n.u.	n.u.	1	5	2	5	4	3 (1)	5 (2)	4 (4)
W 2	L			n.u.	n.u.					2	1 (1)	4	3 (1)
	R			n.u.	n.u.		1					1 (1)	1 (1)
W 3	L			n.u.	n.u.		3	3 (1)	4 (3)	4 (2)	5 (5)	5 (5)	5 (5)
	R			n.u.	n.u.	1	2 (1)	5 (2)	5 (4)	5 (3)	5 (5)	5 (5)	5 (5)
W 4	L			n.u.	n.u.	2	1	1	2	1	2 (2)	n.u.	n.u.
	R			n.u.	n.u.			3	3 (2)	5	1	n.u.	n.u.
S 1	L	3	4	5 (2)	4	5 (2)	5	5 (5)	5 (5)	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
	R	0	2	0	4	0	5	2	5 (2)	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
S Darm		3 (3)		4 (3)		4 (4)		4 (4)		n.u.		n.u.	

M = Muskel; H = Haut; W = Winter; S = Sommer; L = Leer; R = Rund; n.u. = nicht untersucht; (x) = Zahl der Fische oberhalb der Quantifizierungsgrenze log 3,0 KbE/g oder cm<sup>2</sup> im Winter bzw. 3,3 KbE/g oder cm<sup>2</sup> im Sommer; leeres Feld = kein positiver Befund

Bei den Winterforellen 1999 wurden bei der Untersuchung auf *Enterobacteriaceae* erst ab dem 13. Tag in der Mehrzahl der Versuchsdurchgänge Keimzahlen ermittelt, die oberhalb der Quantifizierungsgrenze von log 3 KbE/g oder cm<sup>3</sup> (Tropfplattenverfahren) lagen. Die Keimbelastung der Fische mit *Enterobacteriaceae* war innerhalb der 4 Versuchsgruppen nicht einheitlich hoch, und es zeigten sich starke Schwankungen in den Ergebnissen von Gruppe zu Gruppe. Die Anzahl positiver Proben erhöhte sich während der Lagerung, ebenso die Keimzahlen. Insgesamt waren etwa gleich viel leere und runde Fische positiv. Die Keimzahlen auf der Haut und in der Muskulatur leerer und runder Fische unterschieden sich nicht signifikant. Im Schnitt wurden auf der Haut am 15. Tag der Lagerung bei leeren und runden Fischen Zahlen von log 3,66 +/- 1,0 KbE/cm<sup>2</sup> erreicht. Im Rückenmuskel betrugen die Werte zu diesem Zeitpunkt ca. log 3,23 +/- 0,72 KbE/g.

Im ersten der 3 Durchgänge der Sommerforellen 2001 waren auf der Haut ab dem 7. Tag der Lagerung Keimzahlen oberhalb der methodenbedingten Quantifizierungsgrenze von log 3,3 KbE/cm<sup>2</sup> (Spatelplattenverfahren) zählbar. Am Ende der Lagerung am 11. Tag betrug die *Enterobacteriaceae*-Keimzahl auf der Haut leerer Fische log 4,39 +/- 0,62 KbE/cm<sup>2</sup>, auf der Haut runder Fische log 3,65 +/- 0,53 KbE/cm<sup>2</sup>. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Werten. Im

Bauchlappengewebe ausgenommener Fische wurde die Quantifizierungsgrenze bereits nach 4 Tagen bei 2 von 5 Fischen überschritten. Die hohen Keimzahlen am Ende der Lagerung mit im Schnitt  $\log 5,13$  KbE/g sind möglicherweise auf das Ausnehmen und Waschen der Fische mit Oberflächenwasser der Anlage zurückzuführen. Die Einzelwerte sind in den Tabellen A E-9 bis A E-13 im Anhang aufgeführt.

Die Bauchlappen runder Fische zeigten bis zum Ende der Lagerung kein *Enterobacteriaceae*-Wachstum. Der Darm wies die höchste Belastung auf, hier überschritten bereits am ersten Tag 3 der 5 Proben die Quantifizierungsgrenze und die Keimzahlen stiegen im Mittel auf  $\log 5,63 \pm 2,21$  KbE/g bis zum 11. Tag an (Spanne von  $\log 2$  bis  $\log 7,55$ ).

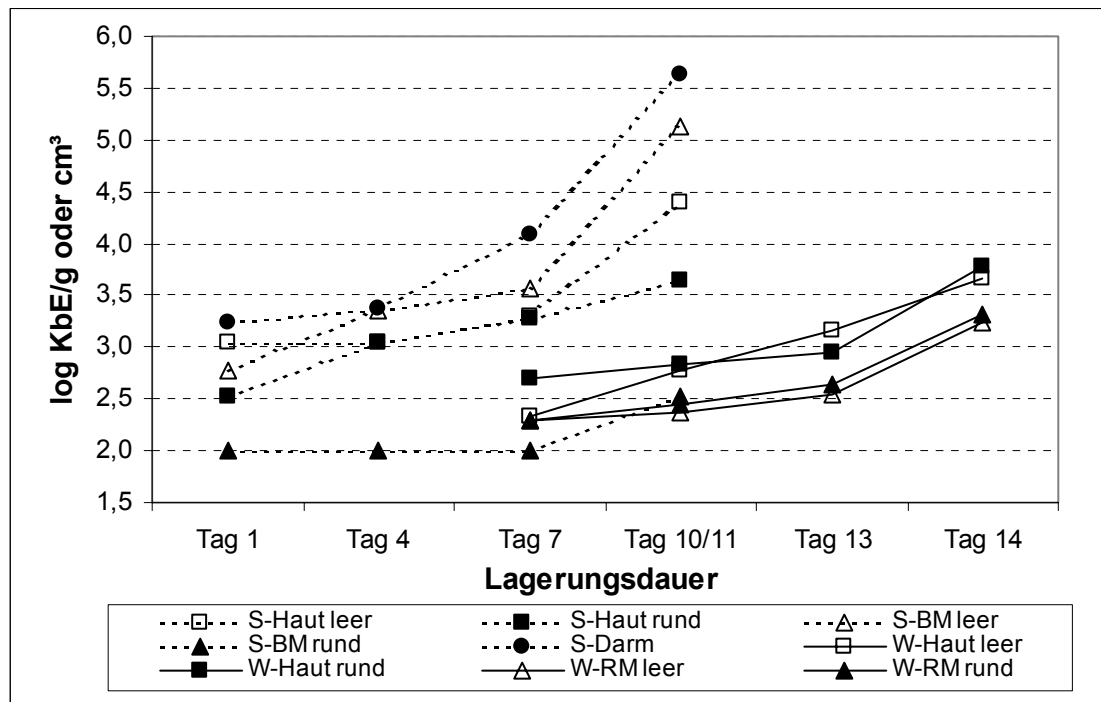


Abbildung 13: Vergleich des *Enterobacteriaceae*-Wachstums auf der Haut, in der Bauchlappen- und Rückenmuskulatur und im Darm von runden und leeren Winter- und Sommerforellen. S = Sommer; W = Winter; BM = Bauchlappenmuskulatur; RM = Rückenmuskulatur

Die Abbildung 13 zeigt einen Vergleich der *Enterobacteriaceae*-Vermehrung auf den verschiedenen Geweben der Winter- und Sommerfische. Dabei erkennt man, dass bei den Sommerfischen zu einem früheren Zeitpunkt der Lagerung erhöhte Keimzahlen festgestellt wurden als bei den Winterfischen.

Es wird deutlich, dass sowohl die äußerliche Belastung an *Enterobacteriaceae* als auch die Keimzahlen in den Muskelgeweben im Sommer um ca. eine Zehnerpotenz höher als im Winter lagen. Grund hierfür könnten höhere Wassertemperaturen im Sommer gewesen sein.

Aeromonas- verdächtige Kolonien bei den Winterforellen wurden nur bei der ersten Versuchsgruppe gefunden. Das Ryan-Medium hatte eine zu geringe Selektivität, so dass viel Begleitflora mit ähnlicher Koloniemorphologie wuchs. Eine korrekte Keimzahl konnte aus diesem Grunde nicht errechnet werden. Als Übersicht ist die Anzahl *Aeromonas*-positiver Fische und die Anzahl *Aeromonas*-positiver Proben in der Tabelle 29 dargestellt. Nur 4 der insgesamt 66 als verdächtig vom Nährboden abgenommenen Kolonien wurden als *A. hydrophila* bestätigt. Den größten Anteil machte *A. ichthiosmia* aus.

Es traten sowohl Fische auf, die auf der Haut und im Muskelgewebe *Aeromonas*-positiv waren, als auch solche, die nur auf der Haut oder nur in der Muskulatur Aeromonaden aufwiesen. Die Anzahl positiver Proben spiegelt also nicht immer die Anzahl positiver Fische wider.

Tabelle 29: Anzahl *Aeromonas*-positiver Haut- und Muskelproben und Anzahl *Aeromonas*-positiver Fische beim Versuchsdurchgang 1 der Winterforellen, n = 5

Tage	10			13			15		
	pos. Fische	M	H	pos. Fische	M	H	pos. Fische	M	H
Leer	4	4	4	5	5	3	5	4	2
Rund	3	1	2	3	2	2	3	2	3

M = Muskelprobe; H = Hautprobe; pos. = *Aeromonas*-positive, leer = ausgenommene, rund = unausgenommene Fische

Insgesamt war die Anzahl an positiven Proben bei den leeren Fischen höher als bei den runden. Aufgrund der Unergebnigkeit der *Aeromonas*- Untersuchung im Winter 1999 und aufgrund einer anderen Fragestellung wurde bei den Sommerforellen auf einen weiteren *Aeromonas*-Nachweis verzichtet.

Listerien wurden qualitativ in den Winteruntersuchungen auf der Haut und in der Rückenmuskulatur von ausgenommenen und nicht ausgenommenen Forellen nachgewiesen. Dabei handelte es sich in allen Fällen um *Listeria innocua*. Es



erfolgten am 0. und am 15. Lagerungstag Tupferproben der Haut und an den Tagen 7, 10, 13 und 15 wurden Muskelproben aus dem vorderen Rückenbereich genommen. Bei den Versuchsdurchgängen 3 und 4 wurden nur am ersten und am letzten Beprobungstag Haut- und Muskelproben genommen. Von den insgesamt 80 Hautproben runder und leerer Fische wurden auf 61,25 % der Fische (28 leer, 21 rund) Listerien nachgewiesen, bei insgesamt 120 Muskelproben waren 42,5 % (33 leer, 18 voll) positiv. Es wiesen somit mehr leere als runde Fische Listerien in der Haut und in der Muskulatur auf, was auf das Waschen der Fische mit Beckenwasser nach dem Ausnehmen zurückzuführen sein könnte. Ein zusätzlicher quantitativer Listeriennachweis bei der Versuchsgruppe 3 ergab am 15. Tag im Muskelgewebe eines runden Fisches eine Keimzahl von  $10^2$  Listerien pro g Gewebe ( $\log 2,0 \text{ KbE/g}$ ). Ferner wurde in allen Oberflächenwasser- und Umgebungsproben sowie in Tupferproben der zur Schlachtung verwendeten Gerätschaften *Listeria innocua* nachgewiesen. Ein Übergang von Listerien von den Geräten auf die Fische bei der Schlachtung und weiteren Handhabung der Fische ist damit als wahrscheinlich anzusehen.

Im Sommer 2001 wurden im ersten der 3 Durchgänge direkt nach der Ankunft der Fische im Institut Hauttupfer von 10 Fischen genommen. Es wuchsen sowohl nach der 1/2-Fraser- als auch nach der Voll-Fraser-Anreicherung keine Listerien auf Palcam- und Oxford-Agar. Somit konnten anhand einer Stichprobe von 10 Fischen nach anderthalb Jahren in der Forellenanlage im Sommer 2001 keine Listerien mehr auf der Oberfläche von Fischen nachgewiesen werden.

## 4.3 Zander

### 4.3.1 Frischegradbeurteilung des gesamten Fisches und sensorische Beurteilung der Filets

#### 4.3.1.1 Beurteilung des Frischegrades

Im Gegensatz zu der Frischegradbestimmung bei den Forellen verlief die Beurteilung der Zander nicht so linear und eindeutig. Im mittleren Abschnitt der Lagerung war die Schätzung der verbleibenden Lagerzeit nicht möglich, da es beim Zander zwischen den Lagerungstagen 3 bis 10 nur zu geringfügigen Veränderungen kam, so dass

Unterschiede nicht scharf getrennt und beschrieben werden konnten. Die mittlere Qualität wurde beim Zander schnell erreicht und dann fast bis zum Ende der Lagerung beibehalten.

Obwohl alle Fische der Gruppe 4 drei Tage unausgenommen geblieben waren und beim Ausnehmen bereits Anzeichen von Autolyse der Innereien zeigten, wiesen sie im Vergleich mit den im April gefangenen Tieren (Gruppe 5) eine etwas längere Haltbarkeit auf. Ausgenommene Fische hatten nach zehn Tagen Lagerung noch eine knappe B-Bewertung mit 4,5 Punkten. Runde Fische hingegen wurden bereits nach 8 Tagen mehrheitlich als nicht mehr verkehrsfähig eingestuft, hier war allerdings die 10-Tage-Note wieder etwas besser. Neben der etwas niedrigeren Wassertemperatur zum Fangzeitpunkt mag dies auch in der ungewöhnlichen Größe der Gruppe 4-Fische begründet liegen. Die kleineren und leichteren Fische der Gruppe 5 verloren innerhalb weniger Tage deutlich an Qualität, alle ausgenommenen wie runden wurden nach 10 Tagen Lagerung als nicht mehr verkehrsfähig eingestuft.

Dabei lagen die Gruppenmittelwerte je Prüfer für ausgenommene Fische an allen Versuchstagen über denen der runden. Eine statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede an den Einzeltagen ist bei 3 bis 4 Urteilen nicht möglich. Fasst man aber alle Ergebnisse einer Gruppe oder beide Gruppen an den Lagertagen 5 bis 8 zusammen, ergibt sich eine statistisch signifikante Besserbewertung der ausgenommenen Fische (Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben, zweiseitig,  $p < 0.05$ ).

Grund für eine Bevorzugung der ausgenommenen Zander waren in erster Linie die bei runden Fischen deutlicheren negativen Veränderungen im Bauchraum. Zum Teil bereits am 3. Tag, im Schnitt aber ab dem 5. Tag entwickelte sich bei den runden Fischen ein unangenehmer bis stinkender Geruch in der Bauchhöhle und eine Erweichung bis Auflösung des Bauchfelles und der darunter liegenden Muskulatur. In den Anfangsstadien traten beide Beobachtungen jedoch auch getrennt voneinander auf. Von der Autolyse wurde zum Teil auch das umliegende Fettgewebe in der Bauchhöhle betroffen, so dass es eine graurötliche Farbe annahm und sich eine fettig glänzende Flüssigkeit im Bauchraum sammelte. Ab dem siebten Tag wurden daher einzelne Fische trotz eines äußerlich noch zufriedenstellenden Eindruckes innen mit weniger als 4 Punkten bewertet, wodurch sich auch die subjektive Gesamtbewertung erheblich verschlechterte. Die Abbildung 14 zeigt den Verlauf der runden Zander der Gruppen 4 und 5.

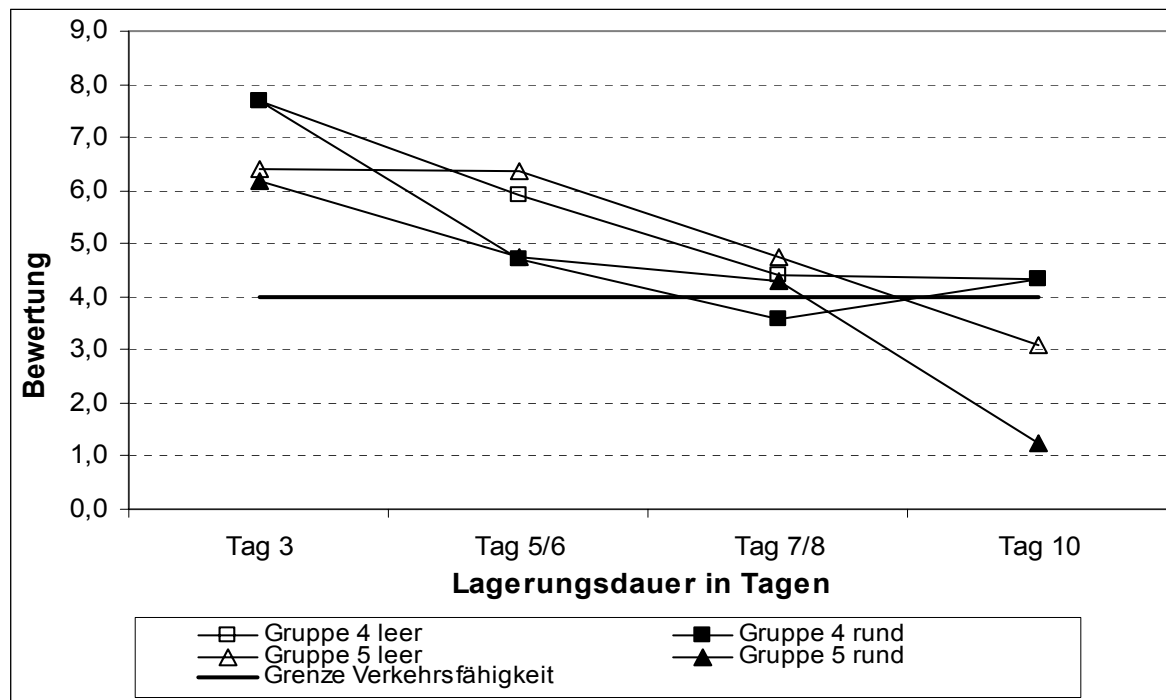


Abbildung 14: Frischegrad-Verlauf (Gesamtbewertung) bei leeren und runden Zandern der Gruppen 4 (n=3) und 5 (n=5)

#### 4.3.1.2 Sensorische Beurteilung der Filets

Anders als bei den Frischegrad-Ergebnissen konnte mit Hilfe der Kochprobe kein signifikanter Unterschied zwischen runden und leeren Fischen festgestellt werden. Bei keinem der Einzelmerkmale Geruch, Aussehen, Mundgefühl und Geschmack ergab sich über den Untersuchungszeitraum in einer der beiden Gruppen eine statistisch signifikante Bevorzugung runder oder ausgenommener Fische (siehe Abbildungen 16 bis 19). Erst am 10. Lagertag, als die runden Fische der Gruppe 5 im Mittel nur noch knapp oberhalb der Verzehrgrenze bewertet wurden, errechnet sich aus der Gesamtzahl aller Benotungen der vier Merkmale eine statistisch signifikante Besserbewertung ausgenommener Fische (Vorzeichentest für verbundene Stichproben, zweiseitig,  $p < 0.05$ ).

Unterschiede zwischen ausgenommen und rund gelagerten Fischen traten im Zander-Filet also entweder später auf als im Frischegrad oder sie sind zu gering, um von dem gewählten Stichprobenumfang erkannt werden zu können.

Die folgende Abbildung 15 zeigt die Gesamtbewertung der Kochproben der Gruppe 5 im Vergleich zum Frischegrad.

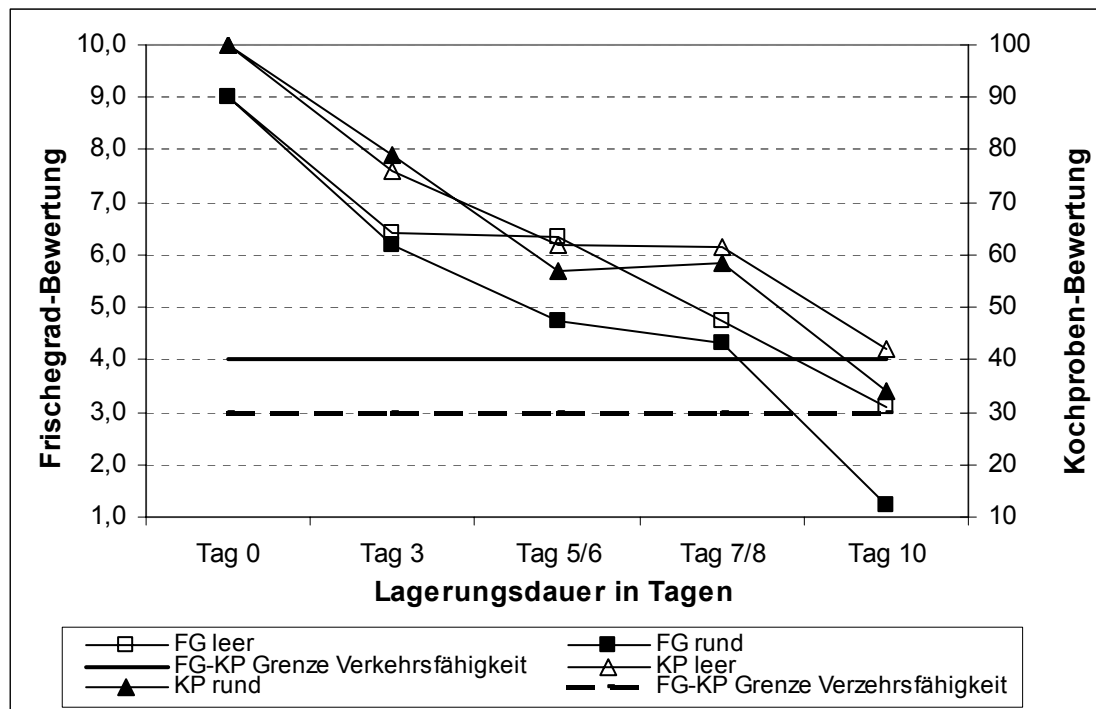


Abbildung 15: Vergleich von Frischegrad (FG) - und Kochproben (KP) - Ergebnissen bei Zandern der Gruppe 5; Gesamtbewertung; leer = ausgenommen, rund = unausgenommen; Tag 0: theoretischer Höchstwert

Die Einzelbewertungen von Geruch, Aussehen, Geschmack und Mundgefühl in der Kochprobenbewertung der Gruppen 4 und 5 sind in den Abbildungen 16 bis 19 auf den folgenden Seiten dargestellt. Dabei erkennt man, dass die Grenzen der Verkehrs- und Verzehrfähigkeit nur vereinzelt am Ende der Lagerung erreicht und unterschritten wurden.

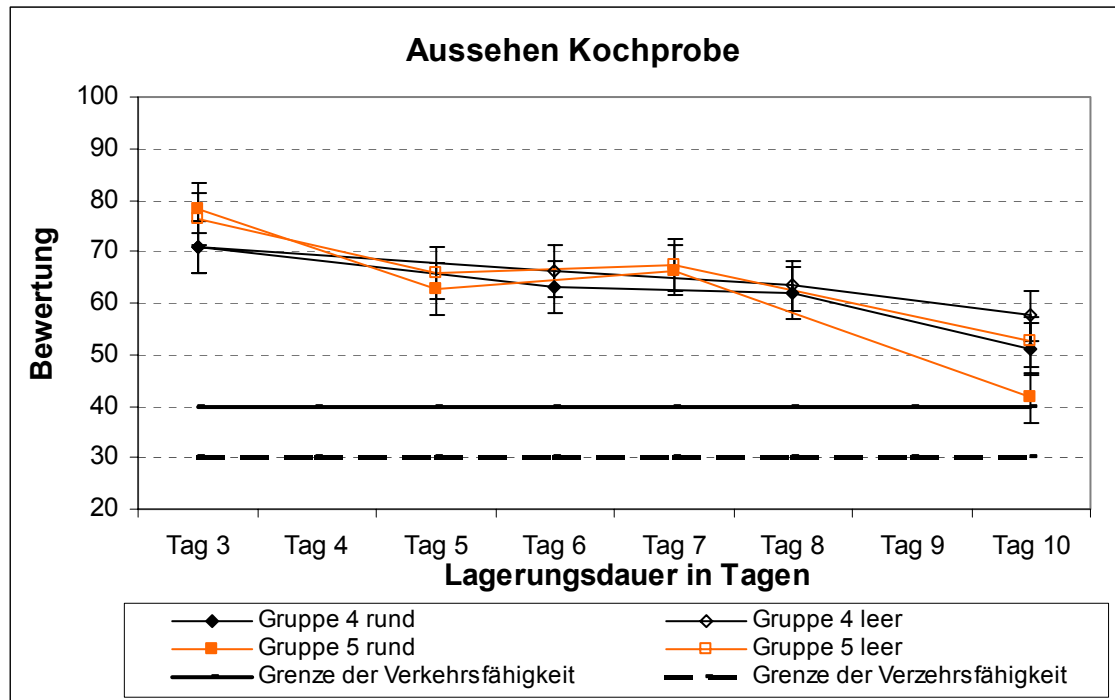


Abbildung 16: Sensorische Veränderungen gekochter Zander- Filets, Gruppen 4 und 5; Beurteilung von Aussehen

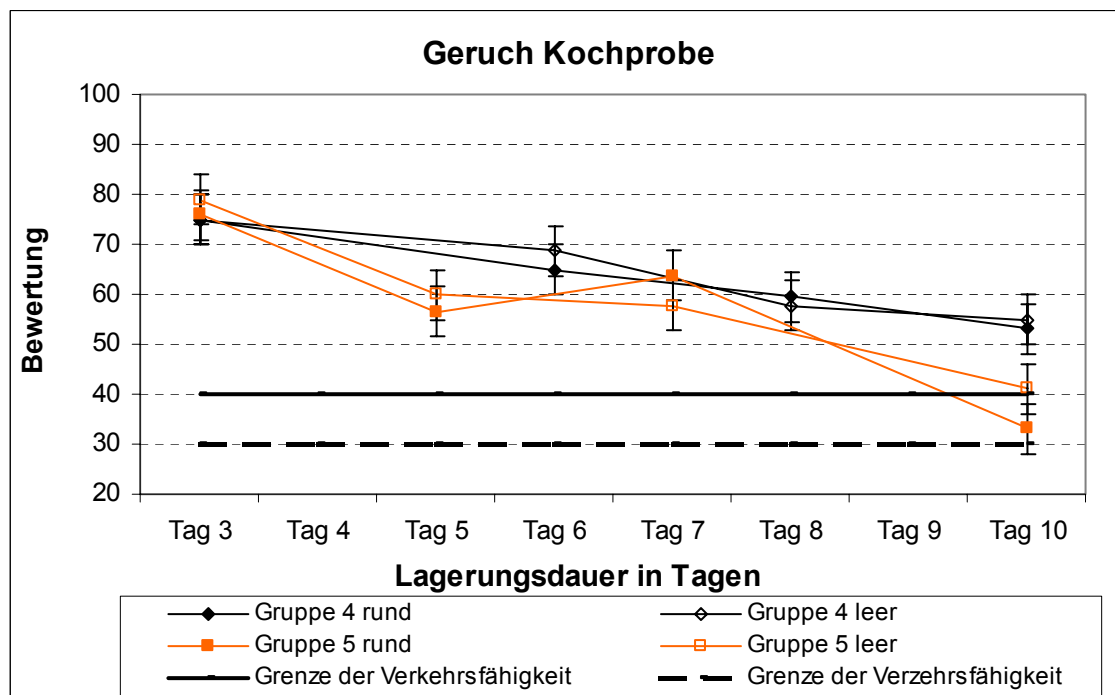


Abbildung 17: Sensorische Veränderungen gekochter Zander- Filets, Gruppen 4 und 5; Beurteilung von Geruch

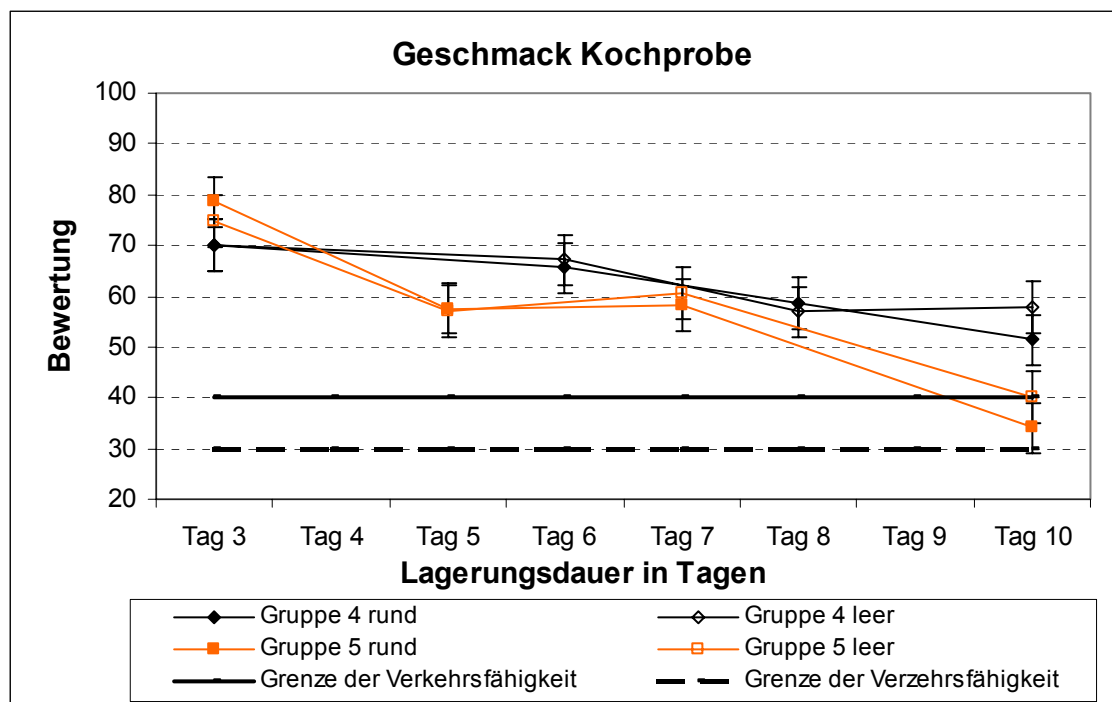


Abbildung 18: Sensorische Veränderungen gekochter Zander- Filets, Gruppen 4 und 5; Beurteilung von Geschmack

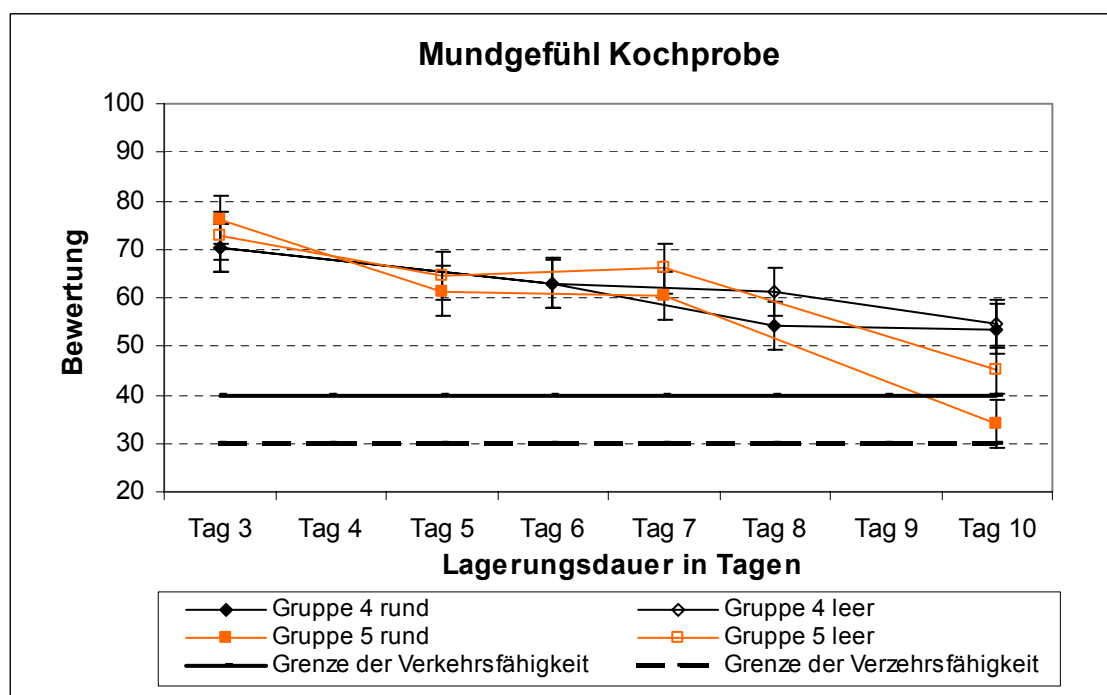


Abbildung 19: Sensorische Veränderungen gekochter Zander- Filets, Gruppen 4 und 5; Beurteilung von Mundgefühl

### 4.3.2 Mikrobiologische Parameter auf der Haut, in der Rückenmuskulatur, im Darm und in der Bauchlappenmuskulatur

#### 4.3.2.1 Verderbniserreger (aerobe GKZ, Shewanellen und Pseudomonaden)

Die bakteriologische Untersuchung wurde an insgesamt 55 Fischen der Gruppe 3 durchgeführt. Die Ergebnisse der beiden Vorversuche, in denen mikrobiologische Bestimmungskriterien ermittelt wurden, dienten nicht dem statistischen, sondern lediglich dem tendenziellen Vergleich mit den Hauptversuchsergebnissen.

In der Abbildung 20 ist der Verlauf der aeroben Gesamtkeimzahlen (GKZ) auf der Haut, im Darm und im Filet als Mittelwerte aus je 5 ausgenommenen und nicht ausgenommenen Fischen dargestellt. Die äußerliche Keimbelastung war am höchsten, Keimzahlen im Darm blieben bis zu einer Dauer von einer Woche gering und erfuhren gegen Ende der Lagerung einen Anstieg. Die Muskulatur blieb nahezu steril (Einzelwerte siehe Tabellen A E-16 bis A E-1 im Anhang).

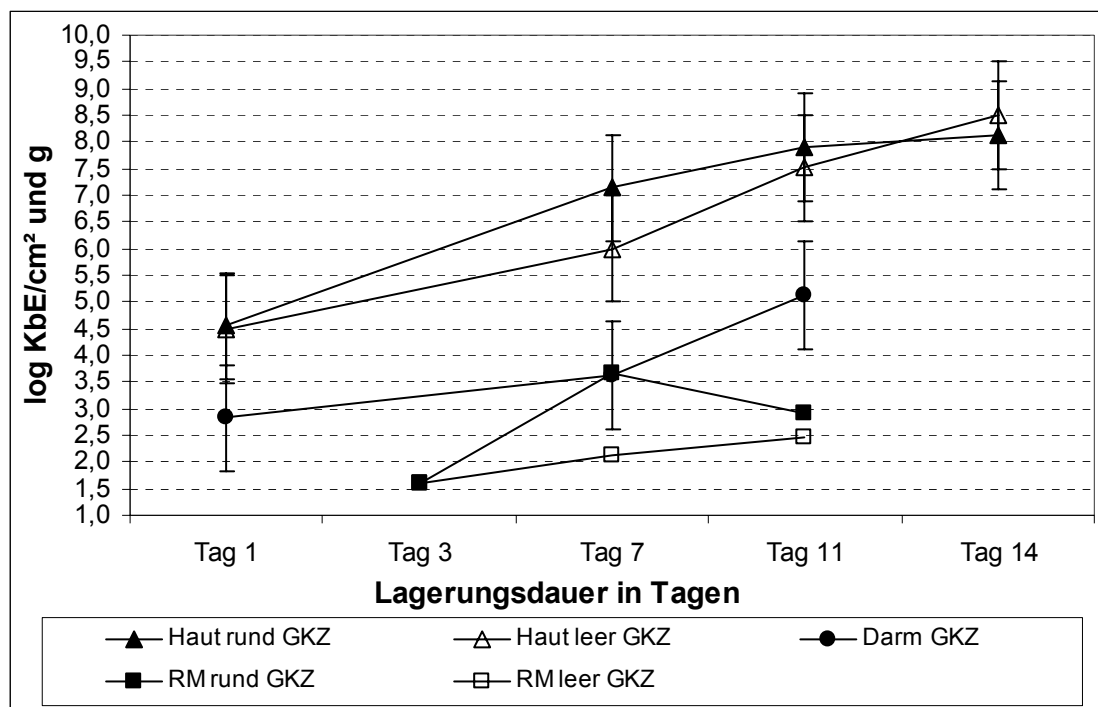


Abbildung 20: Aerobe Gesamtkeimzahlen (GKZ) auf der Haut, im Darm und im Rückenmuskel (RM) von runden und leeren Zandern, Mittelwerte und Standardabweichung, n = 5

### Keimbelastung auf der Haut ausgenommener und unausgenommener Fische

Am Tag nach dem Fang wiesen die ausgenommenen und gewaschenen Fische auf der Haut eine aerobe Gesamtkeimzahl von  $\log 4,5 \pm 0,04 \text{ KbE/cm}^2$  bei sehr geringer Streuung auf. Der Anstieg der Keimzahlen im Verlauf der Lagerung erfolgte nahezu linear auf einen Wert von  $\log 8,51 \pm 0,13 \text{ KbE/cm}^2$  nach 14 Tagen. Die ungewaschenen, nicht ausgenommenen Fische zeigten vom gleichen Ausgangspunkt aus ( $\log 4,54 \pm 0,03 \text{ KbE/cm}^2$ ) einen etwas steileren Anstieg bis zum Tag 7 und erreichten mit  $\log 7,13 \pm 0,41 \text{ KbE/cm}^2$  signifikant höhere Werte ( $p < 0,05$ ), danach kam es zu einer Abflachung des Keimzahlverlaufs und die Gruppe erreichte ab dem Tag 11 mit  $\log 8,12 \pm 0,37 \text{ KbE/cm}^2$  eine vergleichbare Gesamtkeimzahl wie die ausgenommene Gruppe. Das Waschen der ausgenommenen Gruppe könnte somit einen verzögernden Effekt auf die bakterielle Vermehrung gehabt haben.

Die Werte der spezifischen Verderbskeime (*Shewanella putrefaciens*) lagen jeweils etwa eine, die der Pseudomonaden eine halbe Zehnerpotenz unter denen der aeroben Gesamtkeimzahl. Die Einzelwerte sind in den Tabellen A E 18 und 19 im Anhang zu finden.

### Keimbelastung im Darm von unausgenommenen Fischen

Die Ausgangsbelastung im Darm war mit  $\log 2,83 \pm 0,76 \text{ KbE/g}$  deutlich niedriger als die der Haut. Dabei streuten die Werte um fast 30 %, bei zwei von fünf Fischen trat überhaupt kein Wachstum auf den Platten auf (siehe Tabellen A E 17 im Anhang). Bis zum 7. Tag blieb die Zunahme der Keimzahl gering ( $\log 3,5$ ) und erreichte am 11. Tag  $\log 5,13 \pm 0,6 \text{ KbE/g}$ . Auch im Darm waren die Werte für spezifische Verderbskeime und Pseudomonaden stets eine halbe bis eine ganze Zehnerpotenz niedriger. Pseudomonaden erlebten erst ab dem 7. Tag einen starken Anstieg auf  $\log 4,8 \pm 0,59 \text{ KbE/g}$ . Werte um  $\log 5 \text{ KbE/g}$  im Darm am Tag 11 sind im Hinblick auf gesundheitliche Aspekte relativ gering. Eine rasante Vermehrung in den ersten Tagen bei unausgenommenen Fischen kann daher verneint werden. In keinem Fall ließ sich ein Zusammenhang zwischen dem Füllungsgrad des Darmes und der jeweiligen Keimzahl feststellen.



Keimbelastung in der Muskulatur im MPN-Verfahren:

Die Spanne der erfassbaren Keimzahlen wird angegeben mit der Anzahl positiver Felder pro Verdünnungsstufe, die Dreiercodes von 000 bis 555 ergeben, und reicht von <40 MPN/g bis >32000 MPN/g. Umgeformt in die Log-Schreibweise heißt das entsprechend: < log 1,6 bis > log 4,5. Mit Hilfe der MPN- Methode wird somit ein Keimzahl-Bereich von log 1,6 bis log 4,5 KbE/g abgedeckt. Dabei liegt bei einer Anzahl von 000 positiven Feldern die Höhe der wahrscheinlichsten Keimzahl mit einem 95 %-igen Konfidenzintervall zwischen 0 und 136 MPN/g. Bei einem Code von 554 liegt die wahrscheinlichste Keimzahl von 32000 MPN/g zwischen den Konfidenzgrenzen von 8000 bis 92000 MPN/g (log 3,9 bis log 4,96 KbE/g).

Die ermittelten Codes für die Keimzahlen in der Muskulatur nach der 5 tube-MPN-Methode sind in Tabelle A E-16 im Anhang detailliert aufgeführt.

Den Codes werden nach der MPN-Tabelle folgende Keimzahlen zugeordnet, dabei werden die in der MPN-Tabelle angegebenen Keimzahlen mit 20 multipliziert, um das tatsächliche Inoculum von 0,005 ml auf den theoretischen Wert von 0,1 ml umzurechnen:

Tabelle 30: Keimzahlen in Muskelproben von Zander (in MPN/g und in log KbE/g), MPN = most probable number, GKZ = Gesamtkeimzahl, SSO = specific spoilage organism, Pseudom. = Pseudomonas-Keimzahlen.

	Tag 3		Tag 7				Tag 11			
	Muskel rund + leer		Muskel rund		Muskel leer		Muskel rund		Muskel leer	
	MPN/g	LOG	MPN/g	LOG	MPN/g	LOG	MPN/g	LOG	MPN/g	LOG
<b>GKZ</b>	<40	<b>1,60</b>	700	<b>2,85</b>	156	<b>2,19</b>	18400	<b>4,26</b>	680	<b>2,83</b>
	<40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>	4800	<b>3,68</b>	<40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>
	<40	<b>1,60</b>	49	<b>1,69</b>	<40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>	340	<b>2,53</b>
	<40	<b>1,60</b>	>32000	<b>4,50</b>	<40	<b>1,60</b>	40	<b>1,60</b>	700	<b>2,85</b>
	<40	<b>1,60</b>	>32000	<b>4,50</b>	40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>	280	<b>2,45</b>
<b>SSO</b>	<40	<b>1,10</b>	680	<b>2,83</b>	<40	<b>1,60</b>	980	<b>2,99</b>	90	<b>1,95</b>
	<40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>	4800	<b>3,68</b>	<40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>
	<40	<b>1,60</b>	40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>	90	<b>1,95</b>
	<40	<b>1,60</b>	10800	<b>4,03</b>	<40	<b>1,60</b>	40	<b>1,60</b>	2600	<b>3,41</b>
	<40	<b>1,60</b>	10800	<b>4,03</b>	40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>
<b>PS</b>	<40	<b>1,10</b>	420	<b>2,62</b>	<40	<b>1,60</b>	7000	<b>3,85</b>	540	<b>2,73</b>
	<40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>	660	<b>2,82</b>	<40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>
	<40	<b>1,60</b>	220	<b>2,34</b>	<40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>	156	<b>2,19</b>
	<40	<b>1,60</b>	7000	<b>3,85</b>	<40	<b>1,60</b>	80	<b>1,90</b>	10800	<b>4,03</b>
	<40	<b>1,60</b>	2200	<b>3,34</b>	<40	<b>1,60</b>	<40	<b>1,60</b>	40	<b>1,60</b>

Bei der vorliegenden Untersuchung war am Tag 3 die Filetmuskulatur aller 10 Fische steril. Erst ab dem Lagerungstag 7 konnten Keimzahlen in der Muskulatur festgestellt werden. Da aber nie alle 5 Fische der Stichprobe belastet waren, sondern nur 1 bis 4 von 5 und die ermittelten Keimzahlen sehr gering waren, blieb die Filetmuskulatur über den gesamten Lagerungszeitraum nur gering belastet. Innerhalb der Zeitspanne zwischen dem 7. und dem 11. Tag kam es zu keiner bedeutenden Bakterienvermehrung. Einzelwerte innerhalb einer Stichprobe lagen zum Teil zwischen  $< 40$  MPN/g und  $> 32000$  MPN/g, d.h. umfassten sämtliche möglichen Werte der MPN-Methode. Der Mittelwert-Unterschied zwischen rund und ausgenommen gelagerten Fischen am Tag 7 ist wegen der großen Schwankungsbreite der Werte statistisch nicht signifikant. Die Tabelle 31 zeigt, dass sich die am Tag 7 bei runden Fischen größere Zahl positiver Befunde am Tag 11 wieder umkehrt, so dass hieraus keine systematische Höherbelastung runder Fische ableitbar ist. Es lässt sich kein Zusammenhang mit den Haut- und Darmwerten herstellen.

Tabelle 31: Zahl der Darm- und Rückenmuskelproben mit bakteriellem Wachstum im Hauptversuch.

<b>n=5</b>	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 11</b>
Darm	3		4	5
RM nicht ausgenommen		0	4	2
RM ausgenommen		0	3	4

n = Anzahl Rückenmuskel (RM) - und Darmproben pro Stichprobe;  
leeres Feld = keine Untersuchung

Vergleicht man die Ergebnisse der Keimzahlentwicklung in den verschiedenen Fischmatrizes des Hauptversuches (Januar 2001) mit den Ergebnissen der 2 Vorversuche, die im November/Dezember 2000 durchgeführt wurden, so zeigen sich sowohl unterschiedliche Ausgangskeimbelastungen als auch eine unterschiedliche Keimvermehrung (siehe Tabelle 32). Im Vorversuch 1 wurde bereits nach einer Woche Lagerung auf der Haut eine Keimzahl von  $\log 8,8$  KbE/cm<sup>2</sup> nachgewiesen, wohingegen dieser Wert im Hauptversuch nach 14 Tagen nur näherungsweise und im zweiten Vorversuch auch nach 14 Tagen Lagerung nicht erreicht wurde. Auch die Darmbakterien erfuhren im Hauptversuch einen weniger steilen Anstieg auf  $\log$

5,13 KbE/g im Vergleich zu den Vorversuchen mit einem Endkeimgehalt von log 7 KbE/g.

Dies kann bedingt sein durch eine rein zufällige, durch die geringe Größe der Stichprobe verursachte Schwankung, aber auch durch die unterschiedliche Wassertemperatur sowie das Fressverhalten der Fische. Eine höhere Belastung durch eine schnellere Keimvermehrung in den hier nicht untersuchten Sommermonaten kann danach nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 32: Entwicklung der aeroben GKZ (Mittelwerte), der spezifischen Verderbskeime und der Pseudomonaden auf der Haut, im Darm und in der Muskulatur ausgenommener und runder Zander; Vorversuche 1 (n = 45) und 2 (n = 34) und Hauptversuch (n = 55)

in log KbE/g oder cm <sup>2</sup>		Tag 0/1 Tag 3 bei VV2			Tag 7			Tag 14 Tag 11: Muskel (HV)		
		GKZ	SSO	Pseud.	GKZ	SSO	Pseud	GKZ	SSO	Pseud
VV1	Haut	5,00	5,00	5,00	8,80	7,50	7,50	9,00	8,20	8,05
	Darm	4,50	3,75	3,30	5,50	5,30	4,75	7,00	6,25	7,00
	Musk- l	< 1,60	< 1,60	< 2,00	2,50	< 1,60	< 3,30	2,90	2,40	< 3,30
	Musk- r	< 1,60	< 1,60	< 2,00	2,75	2,40	< 3,30	2,70	1,90	< 3,30
VV2	Haut	6,30	5,50	n.u.	7,70	7,20	n.u.	7,90	8,10	n.u.
	Darm	3,40	2,90	n.u.	5,40	5,10	n.u.	7,10	6,50	n.u.
	Musk- l	n.u.	n.u.	n.u.	2,60	2,20	n.u.	3,70	2,50	n.u.
	Musk- r	n.u.	n.u.	n.u.	2,10	< 1,60	n.u.	2,50	1,90	n.u.
HV	Haut- l	4,49	3,35	3,67	6,00	4,95	5,49	8,51	7,36	8,23
	Haut- r	4,54	3,76	3,60	7,13	5,92	6,34	8,12	7,15	7,94
	Darm	2,83	< 2,00	2,26	3,62	3,38	2,80	5,13	4,30	4,80
	Musk- l	< 1,60	< 1,60	< 1,60	3,00	3,00	2,20	2,61	2,76	3,36
	Musk- r	< 1,60	< 1,60	< 1,60	4,11	3,65	3,2	3,57	2,36	3,16

VV = Vorversuch, HV = Hauptversuch, GKZ = Gesamtkeimzahl, SSO = specific spoilage organism, Pseud. = Pseudomonaden, Musk- l/r = Muskel leer/rund, n.u.: nicht untersucht; < = unterhalb der Nachweisgrenze (log 1,6 bzw. log 2,0); < 3,3 = zwischen Nachweisgrenze und Quantifizierungsgrenze

#### 4.3.2.2 Humanpathogene und Indikatorkeime

Wie bereits in Kapitel 4.2.2.2 erläutert, gestaltete sich der Enterobacteriaceae-Nachweis in den vorliegenden Untersuchungen als schwierig und uneindeutig, da sich das VRBG-Medium aufgrund der bei Fischen vorkommenden Begleitflora als wenig selektives Medium für die Untersuchung von Fischmaterial erwies. Auf VRBG-

Agar konnte eine große Anzahl an unterschiedlichen Kolonien wachsen, die vorwiegend nicht oxidase-negativ waren.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Koloniemorphologie und Keimart zu untersuchen, wurden 9 Kolonien verschiedener Morphologie, die auf VRBG-Agar nach der Beimpfung mit Haut- und Darmproben gewachsen sind, weiter differenziert. Es ergaben sich die in Tabelle A E-21 im Anhang wiedergegebenen Ergebnisse. Nur drei der nach der Morphologie als *Enterobacteriaceae* verdächtigen Kolonien waren tatsächlich oxidase-negativ. Von diesen konnte das *Enterobacteriaceae*-spezifische API 20E nur eine als *Enterobacter agglomerans* identifizieren. Die API 20-Einordnungen einiger oxidase-positiver Isolate als *Aeromonas salmonicida* und *Pasteurella multocida* ist wegen der festgestellten Beweglichkeit der Bakterien mit Sicherheit falsch. Es handelt sich aber vermutlich um fischspezifische Begleitflora.

Im Zander-Hauptversuch wurde nur am 7. Lagerungstag auf *Enterobacteriaceae* untersucht. Laut ISO 21528-2: 2000 -Methode mit MPN wurden alle Kolonien, die auf VRBG wuchsen, oxidase-negativ waren und Glucose fermentierten, als *Enterobacteriaceae* angesehen. Haut- und Darmproben waren nur vereinzelt und nur gering mit den so identifizierten Keimen belastet (maximal 0,62 MPN/g oder cm<sup>2</sup>). In der Tabelle A 20 im Anhang kann man die ermittelten Codes für die Keimzahlen nachlesen.

Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei < 0,30 MPN/g (Konfidenzintervall 0,00 bis 1,40 bei 95 %). Die *Enterobacteriaceae*-Gehalte sowohl auf der Haut als auch im Darm von 7 Tagen gelagerten Zandern lagen mit 0,30 bis 0,62 MPN/g oder cm<sup>2</sup> nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze. Die Rückenmuskulatur war frei von *Enterobacteriaceae*.

In den beiden Vorversuchen lag die Zahl der *Enterobacteriaceae* ähnlich niedrig. Die höchsten Werte wurden in beiden Gruppen auf der Haut am 7. Lagerungstag erreicht mit maximal 23 MPN/cm<sup>2</sup>, am Ende der Lagerung lagen die Werte erneut darunter. Die Darmproben der Gruppe 1 waren noch geringer belastet als die Haut, die der Gruppe 2 blieben an allen Untersuchungstagen ebenso negativ wie die Filets.

Auf den Hauttupfern der Eingangsuntersuchung wurden in keinem Fall *Vibrio* spp. bzw. *Aeromonas* spp. nachgewiesen. Keines der als verdächtig angesehenen Isolate

konnte biochemisch als charakteristisch eingestuft werden. In der Tabelle A E-22 im Anhang sind die Untersuchungen der biochemischen Differenzierungsreaktionen detailliert aufgeführt. Eine Erklärung ließe sich in den niedrigen Temperaturen finden, die zum Untersuchungszeitpunkt herrschten, da Vibrionen vorwiegend in den Sommermonaten auftreten.

Darm- und Bauchlappenproben wurden auf ein Vorhandensein von Clostridien untersucht. Die genauen Differenzierungsergebnisse der Untersuchungen sind in der Tabelle A E-23 im Anhang zusammengestellt.

Mit Sicherheit konnten in den untersuchten 15 unausgenommen gelagerten Fischen (insgesamt 30 Darm- und 30 Bauchlappenproben) des Hauptversuches in keiner Darm- oder Bauchlappenprobe Clostridien nachgewiesen werden, da verdächtige Kolonien auch aerob wuchsen. Da sich bei der Gramfärbung zumindest eines Präparates aus dem Darm Sporen erkennen ließen, dürfte es sich zumindest zum Teil um *Bacillus* spp. gehandelt haben, die ubiquitär im Lebensraum von Fischen vorkommen und in der Mehrzahl harmlos sind. Sie können fakultativ anaerob und aerob wachsen und Sporen bilden und sind je nach Wachstumsverhältnissen variabel in ihrem Gramverhalten und in ihrer Katalaseaktivität.

#### **4.3.3 Ergebnisse der Nematodenuntersuchung**

Für den Ostseezander ist ein niedriger Befall mit Nematoden für sehr große Fische beschrieben worden. Um Unterschiede in der Befallsintensität des Bauchlappens bei ausgenommenen und runden Fischen prüfen zu können, hätten mindestens 100 Fische pro Gruppe untersucht werden müssen. Eine solche Fanggröße war nicht zu realisieren. Um trotzdem einen Eindruck von der Nematodenbelastung beim Boddenzander zu gewinnen, wurden in allen Gruppen die Eingeweide der meisten Fische in Pepsin-HCl verdaut und beide Bauchlappen sowie ein Filet, das nicht für andere Untersuchungen benötigt wurde, nach Tiefgefrieren auf UV-fluoreszierende Larven untersucht.

Bei vielen Tieren fanden sich Nematoden in der Muskelschicht des Magens, zum Teil verkapselt, zum Teil durch die äußere Serosa durchgebohrt oder dieser aufgelagert. In der mesenterialen Aufhängung des sackförmigen Magens fanden sich ebenfalls zahlreiche Nematoden, aber auch auf den Geschlechtsorganen und den Mesenterien

des Darmes. Bereits beim Ausnehmen fielen bei einigen Fischen Nematodenlarven auf, die der seitlichen Bauchwand, meist in Magenöhre, angelagert und teilweise eingebohrt waren. Diese wurden zu den durch die Fluoreszenzuntersuchung gefundenen hinzugezählt. Wie die getrennte Untersuchung von Bauchlappen und Filetmuskulatur ergab, fand sich der größte Teil der Nematoden hypaxial, vereinzelt wurden Larven aber auch im Rückenmuskel nachgewiesen, wo sie beim Rohverzehr, z.B. in Form von Sushi, eine potentielle Gefahr für den Verbraucher darstellen.

Die mikroskopische Untersuchung von ca. 100 Exemplaren zeigte die typischen Kennzeichen von *Anisakis simplex* auf: 2,5 bis 3,5 cm Länge, schlank und weiß, spiralig aufgerollt, verdickte Muskulatur des Ventrikels ohne oesophageale oder intestinale Anhänge (Blindsäcke). Der äußeren Erscheinung nach handelte es sich bis auf eine Ausnahme um *Anisakis* spp. Tabelle 33 gibt die Ergebnisse wieder.

Tabelle 33: Ergebnisse der Nematoden-Untersuchung

Gruppe	Fangzeit	Anzahl untersuchter Fische	Länge [cm] Mittelwert + Standardabweichung	Fanggewicht [g] Mittelwert + Standardabweichung	Eingeweide			Muskulatur *					
					mittlere Befallsintensität **	Befallsrate %***	max. Zahl Nematoden	mittlere Befallsintensität	Befallsrate %	davon % pos. Bauchlappen	davon % pos. Filets	max. Zahl Nematoden	% Nematoden in Muskulatur ****
1	Nov	42	47 + 4	1221 + 392	0,8	19	16	0,09	5,7	50	50	2	8
2	Dez	33	53 + 3	1764 + 237	2,3	36	15	0,06	6,1	50	50	1	3
3	Jan	55	53 + 3	1789 + 232	12,5	82	86	0,58	27,3	100	0	5	4
4	April	21	63 + 4	2987 + 562	137,0	100	318	3,00	95,2	100	5	9	2
5	Mai	20	58 + 5	2230 + 621	15,1	80	54	0,30	10,0	100	0	5	2

% = in Prozent; max. = maximale; pos. = positive; \* Bauchlappen: beide, Filet nur eines je Fisch; \*\* mittlere Befallsintensität: durchschnittliche Nematodenzahl pro befallenen Fisch

\*\*\* Befallsrate: Anteil Nematoden-positiver Fische

\*\*\*\* % Nematoden in Muskulatur bezogen auf Gesamtzahl in Muskulatur und Eingeweiden

Die Befallsrate mit Nematodenlarven war bei den fünf untersuchten Gruppen sehr unterschiedlich. Während die kleineren Vorversuchsfische vom November und Dezember 2000 nur wenige Nematoden aufwiesen, waren die Fische der Gruppe 4, die ungewöhnlich groß waren, hochgradig belastet.

Der Anteil der in der Muskulatur gefundenen Nematodenlarven sank mit steigender Gesamtzahl. Von den ca. 112 gefundenen Larven fanden sich 4 % im mittleren Abschnitt des Rückenfilets (jeweils nur 1 Filet untersucht), 27 % teilweise und 68 % ganz in die Bauchlappen eingebohrt.

Die Zahl der Nematoden in den Eingeweiden hing dabei sowohl vom Fangzeitpunkt, d.h. einem jahreszeitlichen Effekt, als auch von der Größe der Fische ab (Abbildung 21). In den Gruppen 4 und 5 ergab sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der Nematodenzahl in den Eingeweiden und der Körperlänge der Fische, während in der Gruppe 3 weder Länge noch Fanggewicht einen signifikanten Zusammenhang mit der Zahl der Eingeweide-Larven erkennen ließen (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, zweiseitig,  $p < 0,05$ ).

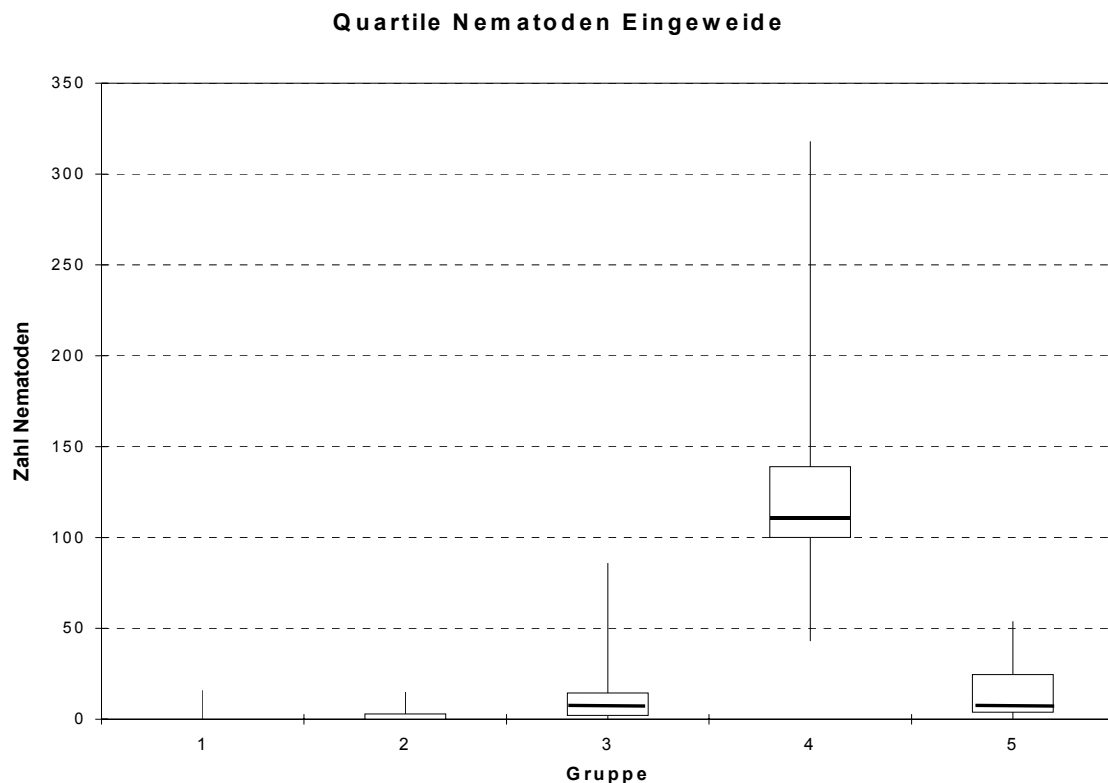


Abbildung 21: Nematodenanzahl in den Eingeweiden der einzelnen Zander-Gruppen

Die Befallsrate mit Nematoden zwischen den Gruppen 3 und 5 war nicht signifikant verschieden (Vergleich zweier Häufigkeiten nach Fischer,  $p < 0.05$ ), wohl aber die Länge (Welch-Test,  $p < 0.05$ ), während es sich bei den Gruppen 2 und 3 umgekehrt verhielt (Länge: t-Test nach Student, zweiseitig,  $p < 0.05$ ; Nematodenzahl: Chi-Quadrat-test), so dass außer der absoluten Größe der Fische ein jahreszeitlicher Effekt, eventuell durch das Auftreten infizierter Beutefische, zu vermuten ist.

#### 4.3.4 Ergebnisse der TVB-N-Bestimmung

Der Gehalt an TVB-N in der Muskulatur wurde in jeweils einem Rückenfilet der 18 leeren und 17 runden Fische der Gruppe 3 untersucht. Tabelle 34 und Abbildung 22 zeigen die Ergebnisse der TVB-N-Bestimmung. Zwischen dem ersten und dem 11. Lagertag kam es weder zu einer signifikanten Zunahme der TVB-N-Gehalte in der Zandermuskulatur noch zu Unterschieden zwischen ausgenommen und rund gelagerten Fischen. Auch die am 14. Lagertag einhellig in einer Frischegradbewertung als verdorben angesehenen Fische blieben mit TVB-N-Werten von etwa 12 mg/100 g Filetfleisch weit unter dem für Seefisch geltenden Grenzwert von 30 – 35 mg/100g Muskelfleisch. Die Grenze der Genusstauglichkeit für Fische der nördlichen Breitengrade wird mit 25 - 30 mg bzw. 30 - 35 mg TVB-N/100 g festgelegt (HUSS, 1988, ABABOUCHE et al., 1996).

Tabelle 34: Zander-Hauptversuch: Bestimmung des TVB-N-Gehaltes (flüchtiger Basenstickstoff) in der Muskulatur leerer und runder Zander

	Tag 1	Tag 7	Tag 11	Tag 14
<b>Fisch - leer</b> mg TVB-N/100 g Muskulatur	10,64 12,49 9,94	11,48 9,97 8,79 11,48 9,69	10,5 11,2 7,25 8,48 10,96	12,88 14,11 10,98 10,75 11,14
<b>Mittelwert</b>	11,02 +/- 1,32	10,28 +/- 0,14	9,66 +/- 1,71	11,97 +/- 1,46
<b>Fisch - rund</b> mg TVBN/100 g Muskulatur	10,72 10,92	11,93 8,9 9,18 10,22 8,96	11,51 10,36 9,13 10,86 8,96	14,06 12,12 13,83 11,17
<b>Mittelwert</b>	10,82 +/- 0,14	9,84 +/- 1,29	10,16 +/- 1,1	12,8 +/- 1,39



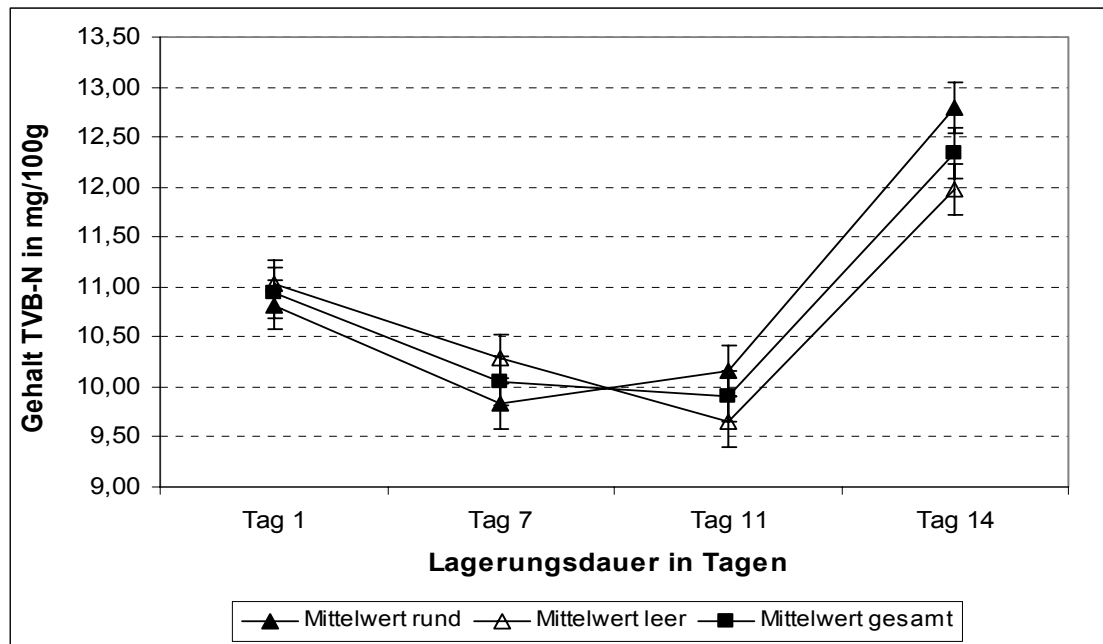


Abbildung 22: Bestimmung des Gehaltes an TVB-N in der Filetmuskulatur von runden und leeren Zandern

Insgesamt betrug die Spanne zwischen dem niedrigsten und dem höchsten ermittelten Wert (7,25 und 14,11) 6,86 g. Da aber auch innerhalb der einzelnen Gruppen an den Lagerungstagen von Fisch zu Fisch Schwankungen auftraten, kann man diese nicht von der Lagerzeit abhängig machen. Die höchsten Werte mit 13 bis 14 mg TVBN/100 g traten am Tag 14 auf.

#### 4.4 Vergleich der mikrobiologischen Befunde mit den sensorischen Beurteilungen bei Regenbogenforellen und Zandern

##### 4.4.1 Regenbogenforellen

In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich in der Untersuchung im Winter 1999 der Verlauf der Gesamtkeimzahlen direkt parallel zum Frischegradverlauf untersucht. Bei den weiteren Durchgängen mit Forellen erfolgten Sensorik-Untersuchungen (Herbst 2000) zeitlich gesondert von bakteriologischen Untersuchungen (Sommer 2001). Auch die Herkunft der Fische für die Untersuchungen war unterschiedlich, so dass ein Vergleich bei diesen Versuchsgruppen nicht durchführbar ist.

Werden Ergebnisse der Sensorik-Untersuchungen und die dazugehörigen mikrobiologischen Daten gegenübergestellt, so erkennt man, dass bei der Betrachtung des Frischegrades die Grenze der Verkehrsfähigkeit im allgemeinen schon erreicht wird, noch bevor kritische mikrobiologische Grenzwerte nachweisbar sind.

In den Winteruntersuchungen erreichten runde Fische im Schnitt auf der Haut zum Zeitpunkt der sensorischen Ablehnung nicht den sensorisch noch wirkungsfreien Grenzkeimgehalt von  $10^6$  bis  $10^7$  KbE/cm<sup>2</sup>. Erst am Tag 13 waren durchschnittliche Keimzahlen von  $10^6$  KbE/cm<sup>2</sup> auf der Haut zu zählen. Zu diesem Zeitpunkt waren auch die leeren Fische als nicht mehr akzeptabel eingestuft worden. In den Rückenmuskelpuben wurde die kritische Keimzahlgrenze im Schnitt nicht erreicht, nur vereinzelt waren Werte  $> 10^6$  KbE/g in der Muskulatur ab dem 13. Tag zählbar. Die Ablehnung der Fische erfolgte in erster Linie aufgrund der Frischegradbewertung. Demzufolge gibt die Bestimmung der Gesamtkeimzahl keinen genauen Hinweis auf die unterschiedlichen Stadien des Verderbs. Der Fisch ist bereits verdorben, wenn die bakterielle Besiedlung noch unterhalb der kritischen Grenze von  $10^6$  bis  $10^7$  KbE/g oder cm<sup>2</sup> liegt.

Die Abbildung 23 fasst die Ergebnisse der 4 Untersuchungsgänge im Winter 1999 zu je einem Keimzahl- bzw. Frischgradverlauf zusammen. Die Achse der Frischegradbestimmung ist umgekehrt aufgetragen, um den Verlauf des Frischegrades und den Verlauf der Gesamtkeimzahl in einer parallelen Darstellungsweise übersichtlicher zu gestalten.

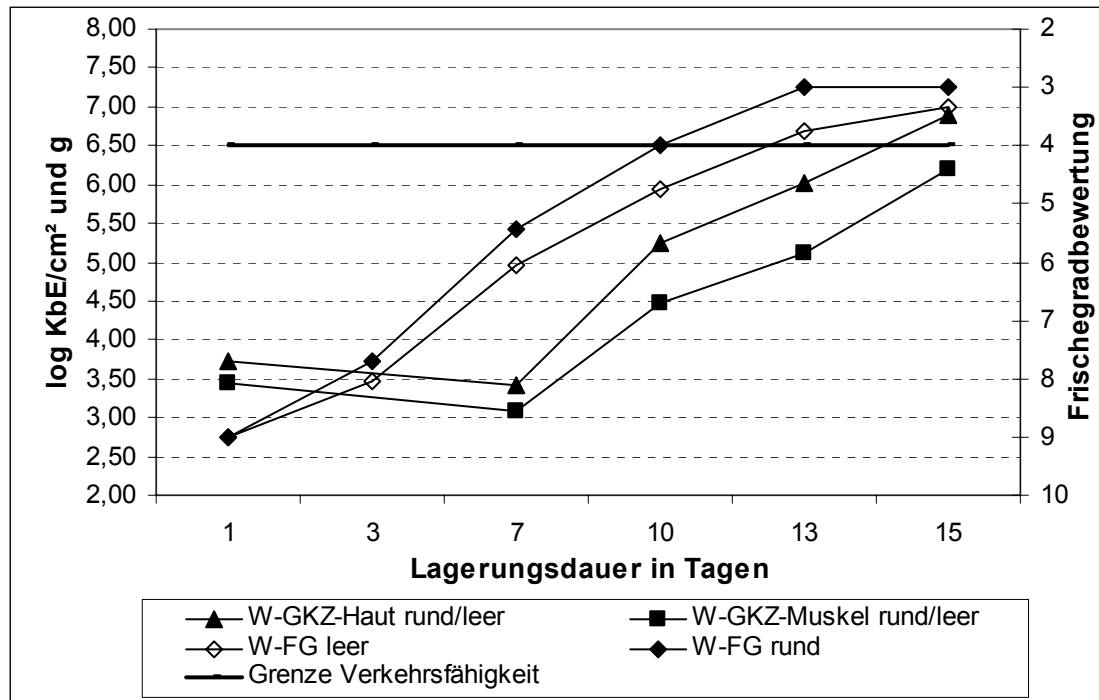


Abbildung 23: Vergleich der Frischegradentwicklung (FG) und Gesamtkeimzahl (GKZ) bei Regenbogenforellen, Versuche 1 bis 4 im Winter (W) 1999. Bewertung des Frischegrades: 9 = Klasse Extra; 4 = BC, Grenze der Verkehrsfähigkeit; < 4 = Klasse C verdorben, log 7 KbE/g und cm<sup>2</sup> = kritischer Wert

Bei den Winterforellen wurden die beschriebenen Ergebnisse auch statistisch untersucht. Zur Prüfung der Korrelation zwischen den Ergebnissen der Gesamtkeimzahlbestimmung und dem Frischegrad wurde der Rangkorrelationskoeffizient von Spearman berechnet. In die Berechnung der Korrelationen gingen die Stichprobenmittelwerte der Gesamtkeimzahlen von Muskel- und Hautproben an den jeweiligen Lagerungstagen ein sowie die Werte des Gesamteindrucks bei der Bestimmung des Frischegrades. Bei  $n = 19$  und einem Kritischen Wert von  $r_s^* = 0,608$  zeigte sich auf dem Niveau von  $\alpha = 0,01$  eine schwache negative Korrelation zwischen den Merkmalen.

Tabelle 35: Korrelation zwischen Frischegrad und Gesamtkeimzahl in der Muskulatur und auf der Haut von ausgenommenen (leer) und nicht ausgenommenen (rund) Regenbogenforellen.

Korrelation zwischen	Korrelationskoeffizient $r_s^*$ nach Spearman
LEER: Muskel-Frische	-0,817**
LEER: Haut-Frische	-0,776**
RUND: Muskel-Frische	-0,739**
RUND: Haut-Frische	-0,791**

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Die beiden Merkmale können entweder eine wechselseitige Abhängigkeit oder eine Abhängigkeit von gemeinsamen Ursachen aufweisen. Eine Abhängigkeit von gemeinsamen Ursachen wie Lagerungsdauer und Temperatur erscheint wahrscheinlich, da sich sowohl Keimzahl als auch Frischegrad in Abhängigkeit zur Lagerungsdauer verschlechtern. Von der Keimzahl kann allerdings nicht direkt auf den Frischegrad geschlossen werden, da der Frischegrad mit unterschiedlich hohen Gesamtkeimzahlen gekoppelt sein kann, wie Abbildung 24 exemplarisch an den Ergebnissen der Korrelationsbestimmung auf der Haut leerer Fische verdeutlicht.

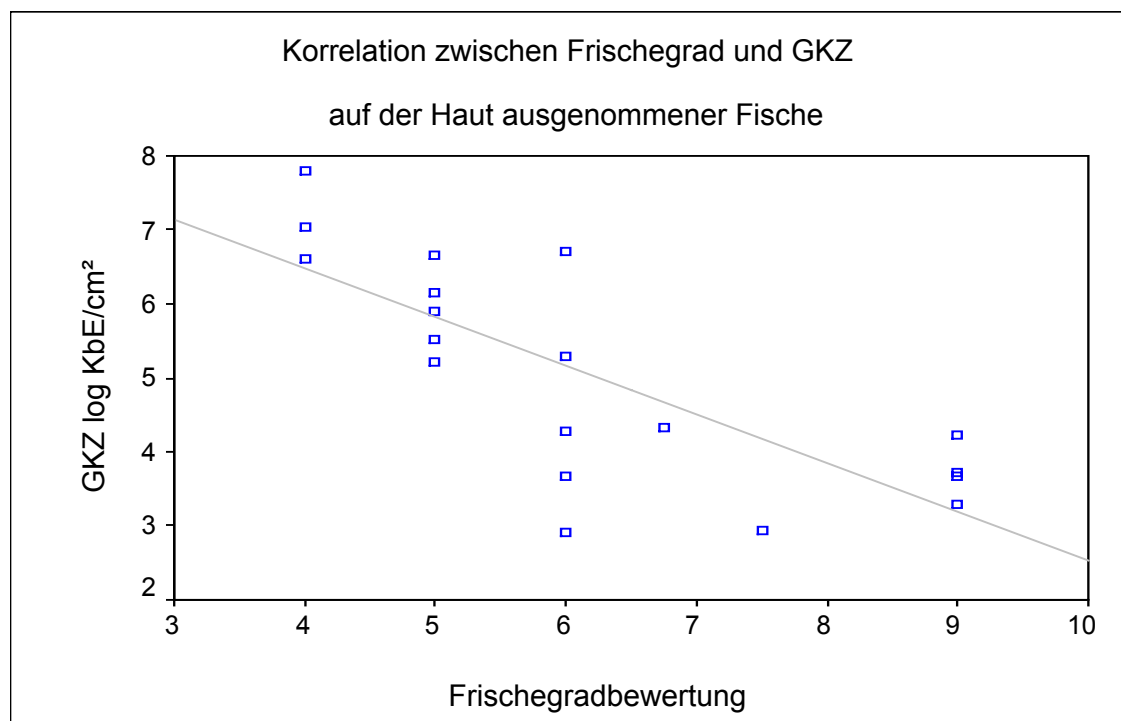


Abbildung 24: Korrelation zwischen Frischegrad und Gesamtkeimzahl auf der Haut von ausgenommenen Regenbogenforellen, Winter 1999

#### 4.4.2 Zander

In der Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Frischegraduntersuchungen der Gruppen 4 und 5 und der Gesamtkeimzahlbestimmung der Gruppe 3 nebeneinander gestellt. Ein direkter Zusammenhang zwischen den drei unterschiedlichen Versuchsgruppen kann durch den Vergleich der Ergebnisse nicht hergestellt werden, da die Fische zu unterschiedlichen Zeiten gefangen wurden und zum Teil auch nicht aus dem gleichen Fanggebiet stammten.

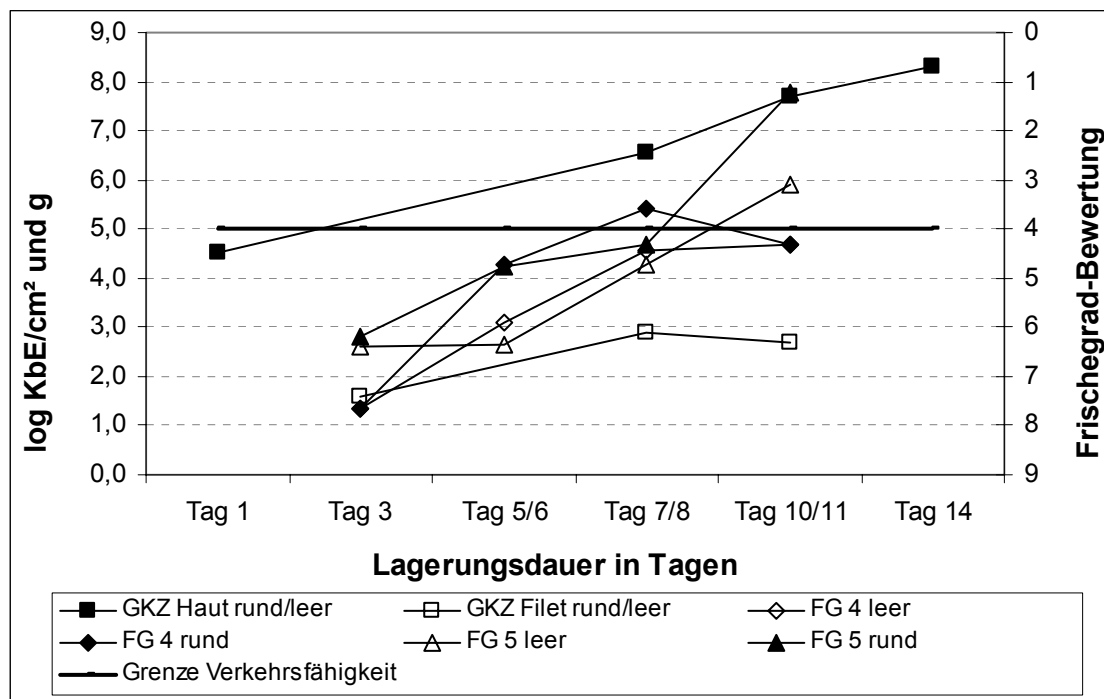


Abbildung 25: Vergleich der Frischegradentwicklung (FG) und der Gesamtkeimzahl (GKZ) auf der Haut und in der Muskulatur von Zandern, Gruppe 4 und 5 für FG-Bewertung, Gruppe 3 für mikrobiologische Untersuchung; Bewertung des Frischegrades: 9 = Klasse Extra; 4 = BC, Grenze der Verkehrsfähigkeit; < 4 = Klasse C verdorben

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahlen auf der Haut von Zandern zeigte nach einer Woche Lagerung mit log 6,5 KbE/cm² bereits Werte über dem sensorisch wirkungsfreien Grenzkeimgehalt von  $> 10^6$  KbE/g. Zu diesem Zeitpunkt lag die Frischegrad-Bewertung der ausgenommenen Fische der Gruppe 4 und 5 noch oberhalb der Verkehrsfähigkeitsgrenze, nur die runden Fische der Gruppe 4 lagen im Schnitt knapp darunter, wurden aber 3 Tage später am Tag 10 mit durchschnittlich 4,5 Punkten wieder besser bewertet. Fische der Gruppe 5 erfuhren nach dem 7. Tag

der Lagerung einen enormen Bewertungsabfall und waren nicht mehr im akzeptablen Zustand. Zur gleichen Zeit stiegen die Keimzahlen auf der Haut auf Werte um  $\log 8$  KbE/cm<sup>2</sup> an, der kritische Grenzwert wurde auch hier überschritten. Hingegen war die Filetmuskulatur zu jedem Zeitpunkt des Versuches sehr gering belastet bzw. steril, erst am 7. Tag wurden Keimzahlen knapp unterhalb von  $\log 3$  KbE/g ermittelt. Eine sensorische Beeinträchtigung des Filets durch bakterielles Wachstum kann in diesem Fall ausgeschlossen werden. Dies äußerte sich in der organoleptischen Untersuchung des Filets durch die Kochprobe, die erst am 10. Tag zur sensorischen Ablehnung der Fischfilets führte.

Grund für die zeitige Ablehnung der runden Fische waren die stark fortgeschrittenen Auflösungsprozesse in den Eingeweiden. Die Keimzahlen im Darm wiesen jedoch bis zum Tag 7 Werte nur knapp oberhalb der Quantifizierungsgrenze von  $\log 3,3$  KbE/g auf. Eine Zurückweisung der Fische erfolgte auch bei den Zandern in erster Linie aufgrund der Befunde der Frischegraduntersuchung und nicht als Reaktion auf die oberflächlichen Keimzahlen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion des Materials sowie der Art und Herkunft der Fische

Die Untersuchungen an Regenbogenforellen und Zandern sollten so praxisnah wie möglich stattfinden, um im Handel vorkommende Zustände simulieren zu können. Für die bakteriologischen Untersuchungen an Regenbogenforellen im Winter 1999 und Sommer 2001 wurden deshalb Tiere normaler Vermarktungsgröße aus einer kommerziellen Zuchtanlage ausgewählt. Gesundheitlicher Zustand, Haltung, Fütterung und Keimbelastung der Fische waren nicht lenkbar, sondern spiegelten die Verhältnisse in der Forellenanlage wider. Beeinflussbar war lediglich die Nüchterungsdauer der Fische, um einen möglichen Einfluss des Füllungsgrades des Magen-Darm-Traktes auf die mikrobielle Belastung der Bauchhöhle zu untersuchen. Für die Sensorikuntersuchungen an Regenbogenforellen im Herbst 2000 war es hingegen wichtig, bei der Fütterung und Haltung der Fische eine exakte Kontrolle zu gewährleisten. Aus diesem Grunde wurden Fische mit gleichem Alter, Größe und Gewicht aus der institutseigenen Kreislaufanlage des Versuchsgutes ausgewählt und 1-2 Wochen vor der geplanten Schlachtung bestimmten Fütterungsplänen unterworfen, um mehrere Gruppen mit unterschiedlichem Füllungsgrad des Magen-Darm-Traktes zu erhalten. Der Einfluss von Fütterungszustand und Schlachthygiene auf die sensorischen Eigenschaften des Ganzfisches und der Filets konnten durch die Variation dieser Faktoren untersucht und ermittelt werden.

Entscheidend für die Wahl von Zandern aus der Ostsee waren mehrere Gründe. Die Fische stammten aus den Tagesfängen der Küstenfischerei. Sie sind repräsentativ für den Handel, da sie über den Großhandel überregional vertrieben und aus diesem Grund auch über einen längeren Zeitraum bis zum Verkauf gelagert werden. Durch diese Bezugsquelle wurde sichergestellt, dass für die erforderlichen Untersuchungsgruppen große Stückzahlen aus einem begrenzten Fanggebiet und vom gleichen Fangtag gewährleistet werden konnten. Betriebe der Binnenfischerei hätten nicht die erforderliche Stückzahl von Zandern pro Fangtag zur Verfügung stellen können, so dass die geforderte Homogenität des Fischmaterials für die Untersuchungen nicht gegeben gewesen wäre. Als weitere Entscheidungskriterien

für Ostseezander zählten die Möglichkeit des Nematodenfundes in den Fischen und das zu erwartende bakteriologische Spektrum auf Zandern aus Brackwassergewässern der Ostsee.

Die Untersuchungsfische wurden spätestens eine Stunde nach dem Anlanden in Eis gekühlt. Durch eine schonende Lagerung unter Eis in handelsüblichen Eislagerkisten wurden bestmögliche Lagerungsbedingungen gewährleistet, so dass ab dem Zeitpunkt des Eintreffens der Fische im Institut Lagerung und Handling als optimal gelten können.

## **5.2 Diskussion der Methode**

### **5.2.1 Frischegradbestimmung und Kochprobe**

Ein Schwerpunkt der Untersuchungen war die Feststellung von qualitativen Unterschieden zwischen ausgenommenen und rund gelagerten Fischen. Durch einen Vergleich der sensorisch wahrnehmbaren Aspekte sollte geklärt werden, ob und wann runde Fische durch Verderbsprozesse des Magen-Darm-Traktes nachteilig beeinflusst werden. Neben der Beobachtung der bakteriell bedingten Verderbsprozesse wurde der Frischeverlauf durch eine Frischegradbestimmung und durch Durchführung von Kochproben der Fischfilets dokumentiert.

Die Frischegradbestimmung der Ganzfische erfolgte in Anlehnung an das in der Europäischen Union akzeptierte und etablierte EU-Qualitätsklassifizierungsschema für Seefische der Vermarktungsnorm Nr. 2406/96. Dieses Schema wurde gewählt, um die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen an Regenbogenforellen und Zandern mit den Ergebnissen der ebenfalls am Projekt beteiligten Arbeitsgruppen an den Instituten in Hamburg und Cuxhaven vergleichen zu können. Das Schema dient der Vereinheitlichung der Klasseneinteilung der angelandeten Ware, lässt sich aber bei Süßwasserfischen nicht uneingeschränkt anwenden. Für diese Fische existiert zur Zeit noch kein einheitliches Klassifizierungsschema. In der vorliegenden Arbeit wurden aus den Merkmalskriterien des EU-Schemas in den Vorversuchen für Zander und Forelle eigene Schemata entwickelt, die den arteigenen Verderbsveränderungen Rechnung tragen. Bei der Lagerung von Regenbogenforellen ließen sich als äußere Kriterien die Merkmalskriterien des EU-Schemas wie die Veränderungen von Augen, Kiemen und Schleim übertragen. Ebenso traten die bei Seefischen genannten



Texturverschlechterungen der Muskulatur auch bei Regenbogenforellen auf. Hingegen konnten eindeutige Farbveränderungen der Haut und der Muskulatur bei Regenbogenforellen nicht beobachtet werden. Auch die für Seefische beschriebenen Veränderungen und leichte Ablösbarkeit des Peritoneums im Zuge der Lagerung trafen bei Forellen aufgrund der sehr dünnen Beschaffenheit des Peritoneums nur bedingt zu, ebenso die zunehmende Verfärbungen der Bauchhöhle entlang der Mittelgräte.

DEUFEL stellte bereits 1963 ein Berechnungsschema für Qualitätsveränderungen von Regenbogenforellen auf. Er bewertete die Beschaffenheit der Oberfläche, der Kiemen, der Augen, des Fleisches und den Geruch mit einer Notenskala von 0 bis 5 und legte sehr genaue Abstufungen der einzelnen Merkmale fest. Seine Beobachtungen der Frischeveränderungen während der Lagerung entsprechen denen der vorliegenden Arbeit. Auch die von DAWOOD et al. (1986) bei Regenbogenforellen aufgestellten Frischemerkmale mit den detaillierten Beschreibungen von Qualitätskriterien stimmen mit den eigenen Ergebnissen überein. Die in den eigenen Untersuchungen festgestellten Texturerweichungen der Muskulatur wurden bei Regenbogenforellen auch von FAERGEMAND (1995) beschrieben. RODRIGUEZ et al. (1999) stellten bei Regenbogenforellen ein anderes Geruchsspektrum beim Verderb fest als bei Seefischen. Danach fehlen bei Forellen die typischen "fischigen Gerüche", die auf die bakterielle Bildung von flüchtigen basischen Stickstoffverbindungen wie Ammoniak und TMA zurückzuführen sind. Die vorliegende Untersuchung bestätigte dies. Bei den Regenbogenforellen konnte über den gesamten Verderbsverlauf hinweg ein Kriterienkatalog entwickelt werden, der feine Abstufungen der Beurteilung und eine gute Einstufung der Forellen erlaubte.

Die Entwicklung eines Frischegradschemas für Zander war schwieriger, da es beim Zander im mittleren Abschnitt der Lagerung über mehrere Tage hinweg nur zu geringfügigen Veränderungen kam. Einige Beurteilungspunkte wie z.B. das Einsinken und die Trübung der Augen oder die Beschaffenheit der Haut und der Kiemen zeigten v.a. zwischen den Lagerungstagen 3 bis 10 keine deutlichen Veränderungen an. Das in Vorversuchen ermittelte Schema war somit besonders geeignet für sehr frische Fische wie auch für Fische mit weit fortgeschrittenem Verderb. Bei den Zandern kann man von einem biphasischen Verlauf der

Frischegradkurve sprechen, während bei den Forellen ein linearer Verlauf beobachtbar war.

Im Anschluss an die Frischegradbestimmung wurde bei den Regenbogenforellen im Herbst 2000 und bei den Zandern jeweils ein Filet des Fisches mit Hilfe einer Kochprobe sensorisch beurteilt. Durch eine Verkostung konnte gezielt der verzehrsfähige Anteil des Fisches bewertet und eine mögliche Einwirkung des fortgeschrittenen Verderbs auf den Muskelanteil beobachtet werden. Es sollte auch die Frage geklärt werden, ob die Verdauungsenzyme aus dem Magen-Darm-Trakt sowie Futterbestandteile und Geruchsstoffe, die durch Verderbsprozesse in die Bauchhöhle des rund belassenen Fisches gelangten, einen Einfluss haben können auf die gustatorischen Merkmale des Filets.

Die Beurteilung der in kochfesten Folien vakuumverpackt gegarten Filets erfolgte wie auch die FG-Bestimmung durch ein geschultes Team aus 3 bis 8 Prüfern, mit deren Hilfe in den Vorversuchen geeignete Begriffe für Geruch, Geschmack, Textur und Aussehen der Forellen- und Zanderfilets während der Lagerungszeit gesammelt und zu einem zugeschnittenen Bewertungsschema zusammengestellt wurden. Um eine hohe Objektivität dieser Methode zu gewährleisten, wurde der ursprüngliche Status (rund bzw. ausgenommen) verschlüsselt. Diese Methode war vergleichbar mit Kochprobenschemata anderer Untersucherguppen. So verwendeten OSTRANDER und MARTINSEN (1976) eine absteigende 9-Punkte-Skala bei der sensorischen Beurteilung von gebackenem Lachs- und Forellenfilet und bewerteten Geruch, Geschmack, Textur sowie Saftigkeit und Farbe. Bei der sensorischen Bewertung von Schleien wurden Mischproben aus jeweils 5 Filets in Kochbeuteln gekocht und Aussehen, Geruch, Geschmack und Textur nach einer 9-Punkte-Skala mit 9 = sehr gut, 1 = genussuntauglich und 3 = Grenze der Verzehrsfähigkeit bewertet (KARL et al., 2001). Ebenso beurteilten RODRIGUEZ et al. (1999) diese Merkmalskriterien bei gekochten Regenbogenforellenfilets anhand einer 5-Punkte-Skala (4 bis 0).

Einige Autoren vertreten die Auffassung, dass die wissenschaftlich betriebene Sensorik die geeignetste Methode bei der Einschätzung der Verkehrsfähigkeit von Frischfisch ist (PRIEBE, 1984, OEHLENSCHLÄGER, 1999).

### 5.2.2 Bakteriologische Untersuchungen

Die Entnahmeart von Gewebeproben bei Fischen kann unter Umständen einen Einfluss auf die festgestellten Keimzahlen haben. So sind in der Literatur verschiedene Arten der Probenentnahme bei Fisch genannt. Einige Autoren beschreiben eine Probenentnahme der Rückenmuskulatur, bei der die Haut des Fisches großflächig mit 95 %-igem Ethanol behandelt, abgeflammt und anschließend entfernt wird. Dies verringert das Risiko, dass Keime der Haut die Gewebeprobe kontaminieren (HERBORG und VILLADSEN, 1975; SCOTT, 1986). Auch MEYER und OEHLENSCHLÄGER (1996) entfernten die Haut von Wittlingen großflächig und achteten darauf, dass die Entnahmestelle der Muskelprobe mindestens 0,5 cm von den Hauteinschnitten entfernt lag.

Bei den Regenbogenforellen der Winteruntersuchungen 1999 wurde mit einem sterilen Skalpell 10 cm<sup>2</sup> der Haut mit Hilfe einer sterilen Schablone umschnitten, abpräpariert und das darunter liegende Muskelgewebe einschließlich der Schnittkante entnommen. Eine Übertragung von Hautkeimen in die Muskelprobe über die Schnittführung kann daher nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung der vorliegenden Arbeit bewegen sich aber im Rahmen der Werte anderer Untersuchungen und liegen nicht höher, was für eine geringe Verschleppung von Keimen beim Schnitt durch die Haut in das Gewebe spricht. Darauf soll weiter in Kapitel 5.3.2. eingegangen werden. In den späteren Untersuchungen mit Zandern wurde zunächst die Haut großflächig entfernt, bevor die Muskelprobe aus der Mitte der freigelegten Fläche entnommen wurde. Somit wurde sichergestellt, dass keine Kontamination des Muskelgewebes durch die Einschnitte erfolgen konnte.

Die gewählten Methoden der Probenaufbereitung und die Nachweisverfahren zur Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl auf der Haut, in der Muskulatur und im Darm sowie die Nachweisverfahren für einige humanpathogene Keime wie Listerien oder Salmonellen entstammen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG und den DIN-Normen. Andere Methoden wurden in Anlehnung an Angaben in der Literatur durchgeführt, wie die Untersuchung auf Clostridien (BAUMGART, 1998) oder Vibrionen (BOCKEMÜHL, persönliche Mitteilung) bei Zandern, oder es handelte sich um hauseigene erprobte

Methoden und Laborarbeitsanweisungen. Zum Teil wurden die Methoden modifiziert, um sie auf Fischgewebe anwenden zu können.

Aufgrund der strengen Vorgehensweise bei den Methoden der Amtlichen Sammlung nach § 35 unterliegt auch die Berechnung der Keimzahlen einer vorgeschriebenen Formel. Sind keine koloniebildenden Einheiten in der Erstverdünnung nachweisbar, so wird kein Nullwert, sondern die Keimzahl der Nachweisgrenze angegeben. Aus diesem Grunde liegen die Keimzahlen aller Proben nie unterhalb von log 2,3 (Tropfplattenverfahren) bzw. log 2,0 KbE/g (Spatelplattenverfahren). Diese Methode erwies sich für den Nachweis von Keimen in der Muskulatur als zu unempfindlich. Da die Keimzahlen in der Rückenmuskulatur in den ersten Untersuchungen bei den Regenbogenforellen im Winter 1999 über einen längeren Lagerungszeitraum sehr niedrig waren, wurde bei den Zanderuntersuchungen die empfindlichere 5-tube-MPN-Methode des kooperierenden Hamburger Institutes gewählt. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte ein Keimzahl-Bereich von log 1,6 bis log 4,5 KbE/g abgedeckt, d.h. auch niedrigere Keimzahlen als log 2 bzw. log 3 ermittelt werden. Diese Methode ist für Fischmuskelp Proben, bei denen während der ersten Lagertage in der Regel von einer Sterilität ausgegangen wird, besser geeignet als die Methode der Amtlichen Sammlung nach § 35.

Für die Isolierung von *Aeromonas* spp. aus Lebensmittel- und Umweltproben werden in der Literatur verschiedene Medien diskutiert. Die Ergebnisse sind zum Teil widersprüchlich und führen zu entgegengesetzten Empfehlungen für die Wahl eines geeigneten Selektivmediums für die quantitative Bestimmung von Aeromonaden. Beispielsweise verglichen TSAI und CHEN (1996) an Muschel- und Fischproben die Selektivität von drei verschiedenen, für den Nachweis von *Aeromonas* spp. empfohlenen Medien und ermittelten mit Ryan-Agar die schlechtesten Ergebnisse. Auch GOBAT und JEMMI (1995) erhielten beim Vergleich von 7 Selektivmedien mit Ryan-Agar die niedrigste Wiederfindungsrate von Aeromonaden aus Fisch- und Fleischprodukten. Hingegen erzielten PIN et al. (1994) mit Ryan-Agar gute Ergebnisse mit einer Wiederfindung von *A. sobria* von 95,5 % in Lebensmittel- und Wasserproben.

Aufgrund von eigenen Voruntersuchungen wurde in den Winteruntersuchungen 1999 an Regenbogenforellen für den Nachweis von Aeromonaden das Ryan-Medium ausgewählt, da es im Vergleich mit vier anderen in der Literatur empfohlenen

Nährböden die höchste Selektivität und Sensibilität aufwies. Während im ersten der vier Versuchsdurchgänge noch *Aeromonaden* quantifiziert werden konnten, ergaben sich bei der Verwendung des Ryan-Agars in den nachfolgenden Versuchsdurchgängen einige Schwierigkeiten. Auf der Platte wuchs viel Begleitflora mit ähnlicher Morphologie, wodurch sich die Bestimmung der verdächtigen Kolonien als sehr aufwändig erwies; das Medium zeigte eine zu geringe Selektivität. Bei der qualitativen Untersuchung auf *Aeromonaden* auf der Hautoberfläche von Zandern zeigten sich ähnliche Selektivitätsprobleme des Mediums, eine stark wuchernde Begleitflora machte eine Abgrenzung von *Aeromonaden* gegenüber anderen Bakterien schwierig. Hier erwies sich bei weiteren Differenzierungsreaktionen rund ein Drittel der Isolate auf Ryan-Agar nicht als *Aeromonas* spp. Von den als *Aeromonas*-verdächtig untersuchten Kolonien konnte keine einer Spezies zugeordnet werden, auch nicht durch das API-System. Ergebnisse der oben genannten Studien sowie die der eigenen Untersuchungen lassen darauf schließen, dass für die Isolierung von *Aeromonas* spp. gerade aus Fischproben zur Zeit noch kein optimales Nährmedium existiert.

Für den Nachweis von *Enterobacteriaceae* wurde in Anlehnung an die Methode der Amtlichen Sammlung nach § 35 LMBG L 06.00-25 zur Bestimmung dieser Keime bei Fleisch und Fleischerzeugnissen VRBG-Agar als Selektivmedium (ohne weitere Bestätigungsreaktionen) gewählt. Die Koloniemorphologie von *Enterobacteriaceae* auf VRBG ist stark unterschiedlich, so werden kleine, trockene, dunkelrote sowie auch große, feuchte, weiße Wachstumsformen als *Enterobacteriaceae* angesehen. In der Methode heißt es, dass auch Kolonien, die rosa sind und/oder keine Präzipitationshöfe aufweisen, mitzuzählen sind. In den Erläuterungen der Methode wird darauf hingewiesen, dass bei anaerober Bebrütung „unter Verzicht auf Subkultivierung und Oxidase-Test alle Kolonien als *Enterobacteriaceae* ausgezählt [werden].“ Die Bestätigung von Einzelkolonien nach Reinzucht durch den Oxidasetest wird in der Methode wegen des großen Arbeitsaufwandes als nicht praktikabel angesehen.

Da auch atypische Kolonien beim Wachstum auf VRBG zu der Familie der *Enterobacteriaceae* gehören können, verwendeten LEROI et al. (2001) bei ihrer Untersuchung an kaltgeräucherten Lachsen unterschiedliche Zählarten zur Keimzahlbestimmung von *Enterobacteriaceae*. Zum einen zählten sie alle

gewachsenen Kolonien auf VRBG-Agar, zum anderen nur Kolonien mit der für *Enterobacteriaceae* typischen Wachstumsform, nutzten jedoch den Gesamt-*Enterobacteriaceae*-Gehalt bei der Interpretation ihrer Ergebnisse.

Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass sowohl typische als auch untypische Kolonien zu einem großen Teil keine *Enterobacteriaceae* sein können.

Zunächst erwies sich das gewählte Medium in Beimpfungsversuchen bei den eigenen Vor-Untersuchungen als sehr zuverlässig, in den Hauptversuchen mit Forellen- und Zander-Proben wuchs aber auf VRBG-Agar eine große Anzahl an unterschiedlichen und zum Teil oxidase-positiven Kolonien. Dieses Medium scheint bei Fischproben im Gegensatz zu Fleischproben wegen der spezifischen Fischflora wenig selektiv für *Enterobacteriaceae* zu sein und somit wenig geeignet für den *Enterobacteriaceae*-Nachweis in Fischgewebe. Der § 35-Methode folgend wurden aber bei der Auswertung alle Kolonien in die Keimzahlberechnung eingebracht, da eine Durchführung des Oxidasetests bei sämtlichen Kolonien zu arbeitsaufwändig gewesen wäre. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss aufgrund der methodenbedingten Einschränkungen von einem Maximalwert mit zum Teil falsch-positiven Keimen ausgegangen werden, bei dem einige der oxidase-positiven und somit falsch-positiven Keime mit eingerechnet wurden. Somit wäre eine Überbewertung der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen denkbar. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch LAGRANGE (2002) in seiner Arbeit. Etwa 10 bis 30 % der aufgrund der variablen Koloniemorphologie von *Enterobacteriaceae* eigentlich zu dieser Familie zu zählenden Kolonien waren oxidase-positiv oder nicht zum fermentativen Glucoseabbau fähig und schieden damit als *Enterobacteriaceae* aus.

Bei den Sommerforellen wurden, um den Anteil der auf VRBG-Agar gewachsenen *Enterobacteriaceae* zu erfassen, insgesamt 21 unterschiedliche Kolonieformen auf VRBG-Agar weiter mit API 20 E biochemisch differenziert. 3 der 21 Kolonien waren oxidase-positiv und schieden demnach als nicht-*Enterobacteriaceae* aus. Eine davon erwies sich mit Hilfe von API 20 E mit einer guten Identifizierung als *Aeromonas hydrophila/caviae*. Von den restlichen 18 oxidase-negativen Keimen wurde zweimal *Hafnia alvei* und einmal *Escherichia vulneris* identifiziert, andere Keime waren gar nicht oder nur ungenügend identifizierbar.

Eine mögliche Einschränkung der Selektivität des VRBG-Nährbodens für *Enterobacteriaceae* wird auch vom Hersteller des Nährbodens bestätigt, da auch

einige mitwachsende Begleitkeime (z.B. *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp.) durch eine Rotfärbung der Kolonien die gleichen Reaktionen wie *Enterobacteriaceae* zeigen können (OXOID, 1993). Da Aeromonaden bei Fischen zur natürlichen Keimflora gehören, und ihr Vorkommen in mehreren Zehnerpotenzen pro g bzw. cm<sup>2</sup> häufig beschrieben wird (Huss, 1995), ist ihr Vorhandensein auf Fischproben sehr wahrscheinlich.

So heißt es auch in den Empfehlungen von BAUMGART (1996), dass zur Unterscheidung von Aeromonaden und *Enterobacteriaceae* mindestens 10 verdächtige Kolonien pro Probe reingezüchtet werden sollten, der Oxidasetest durchgeführt und auf die Fähigkeit des fermentativen Glucoseabbaus getestet und anschließend das prozentuale Verhältnis des Vorkommens von *Enterobacteriaceae* errechnet werden sollte.

Für den Nachweis dieser Keime bei den Zandern wurde die ISO-MPN-Methode 21528-2: 2000 (E) angewandt. Sie schließt von vornherein die Keime, die nicht oxidase-negativ und nicht in der Lage sind, Glucose zu fermentieren, aus. Diese Methode ist bei Untersuchungen an Fischgewebe vorzuziehen, ist jedoch bei routinemäßigen Untersuchungen mit großem Probenaufkommen aufgrund des erheblichen Arbeitsaufwandes schwer durchführbar. In Kapitel 0 wird näher auf die Ergebnisse des *Enterobacteriaceae*-Nachweises eingegangen.

## **5.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.3.1 Diskussion der Ergebnisse der Frischegradbestimmung und der sensorischen Beurteilung der Filets durch die Kochprobe**

Die durch die Frischegradbestimmung äußerlich sichtbaren Verderberscheinungen an Augen, Kiemen, Schleim und Elastizität des Muskelfleisches entwickelten sich bei Zandern und Regenbogenforellen unterschiedlich schnell, traten aber meist bei ausgenommenen und rund gelagerten Fischen zur gleichen Zeit auf. Abweichende Bewertungen zwischen runden und leeren Fischen sowie die schnellere Ablehnung der vollen Fische waren vor allen Dingen auf deutliche Unterschiede der Bauchhöhlenbeschaffenheit zurückzuführen. Grund war der fortgeschrittene Verderb der sich auflösenden Organe im Bauchraum und der sich daraus entwickelnde

unangenehme Geruch. Ausgenommene und runde Regenbogenforellen der Frischegraduntersuchungen im Winter 1999 und im Herbst 2000 behielten überwiegend bis zum dritten Tag E- oder EA-Qualität. Erst ab dem 7. Tag traten deutliche Qualitätsunterschiede zwischen ausgenommenen und nicht ausgenommenen Fischen auf. Während der Winteruntersuchungen erreichten die runden Fische im Durchschnitt bereits am 10. Tag BC- oder C-Qualität und waren somit an der Grenze der Verkehrsfähigkeit, die leeren Fische erst am 13. Tag. In den späteren Untersuchungen im Herbst wurden diese Grenzen einige Tage früher, an den Tagen 9 bis 11 erreicht. Der dominierende Faktor bei der Ablehnung der runden Fische waren demnach die lytischen Prozesse, die sich vom Verdauungstrakt ausgehend auf den gesamten Bauchraum ausdehnten. Im Gegensatz dazu waren bei den ausgenommenen Fischen die Veränderungen in der Bauchhöhle (Verfärbungen der Bauchlappen sowie Geruchsabweichungen) in etwa zur gleichen Zeit beobachtbar wie die äußerlich sichtbaren Verderbsvorgänge an Augen, Kiemen und Hautschleim. Ähnliche Entwicklungen zeigten ausgenommene und nicht ausgenommene in Brackwasser kultivierte Regenbogenforellen, die 11 Tage ohne Eis bei + 4°C lagerten (TESKEREDZIC und PFEIFER, 1987). Erst am fünften Tag wurden leichte sensorische Unterschiede beobachtet. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Änderungen in den sensorischen Merkmalen ab dem 7. Tag und signifikante Unterschiede zwischen ausgenommenen und runden Forellen ab dem 9. Tag auftreten. In einer Untersuchung von RODRIGUEZ et al. (1999) behielten ausgenommene Regenbogenforellen bis zum sechsten Tag der Eis- und der Kühlschranks Lagerung nach dem EU-Qualitätsklassifizierungsschema und einer Kochprobe akzeptable Frischemerkmale, unausgenommene Fische entsprachen schon am fünften Tag nicht mehr den geforderten Frischekriterien. Auch DAWOOD et al. (1986) stellten bei runden Forellen, die vor der Eislagerung 6 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurden, eine ähnlich stark verkürzte Haltbarkeit wie bei den Regenbogenforellen der vorliegenden Untersuchung fest.

Aufgrund der unterschiedlichen Herkunft der Winter- und Herbstforellen kann eine eindeutige Ursache für die einige Tage früher eintretende sensorische Ablehnung der runden Herbstfische im Gegensatz zu den runden Winterfischen nicht bestimmt werden. Die Fische für die Sensorikuntersuchungen im Herbst stammten aus den Wassertanks der institutseigenen Kreislaufanlage (KA) des Versuchsgutes und nicht wie die Winterfische aus einer Forellenwirtschaft. Diese waren in den kalten



Wintermonaten den Witterungsverhältnissen stärker ausgesetzt als die Institutsfische. Man geht davon aus, dass sich aufgrund der poikilothermen Natur von Fischen der Stoffwechsel mit unterschiedlich hohem Stoffumsatz, die Ernährungsansprüche und das Fressverhalten im Laufe des Jahres in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur ändern. In den Wintermonaten ist die Nahrungsaufnahme bei vielen Fischen herabgesetzt (LAGLER et al., 1977). Die Temperatur beeinflusst die Sekretionsrate und die Aktivität von Verdauungsenzymen, die Absorptionsrate der verdauten Nahrung und die Muskelaktivität des Verdauungstraktes (BOND, 1996). Auch die Verweildauer der Nahrung im Darmtrakt ist temperaturabhängig und artverschieden (FIEDLER, 1991). Somit haben bei wärmeren Temperaturen die Verdauungsenzyme des Magen-Darm-Traktes eine stärkere Wirkung und können während der Lagerung post mortem zu früher eintretenden lytischen Abbauprozessen in den Eingeweiden führen.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der Frischegradbeurteilung der Forellen waren auch die Ergebnisse bei den Zandern. Durch eine Zusammenfassung der Ergebnisse beider Untersuchungsgruppen von Zandern an den Tagen 5 bis 8 konnte nach dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben eine statistisch signifikante Besserbewertung der ausgenommenen Fische ermittelt werden, was ebenfalls auf die Veränderungen im Bauchraum zurückzuführen war. Bereits teilweise ab dem 3. Tag, im Schnitt ab dem 5. Tag war ein unangenehmer stinkender Geruch sowie die enzymatische Auflösung der Bauchlappenmuskulatur feststellbar.

Die Beobachtungen der Lagerfähigkeit der einzelnen Fischarten entsprechen in etwa den Ergebnissen der Arbeiten anderer Autoren, wonach ausgenommene Fische länger akzeptable Frische halten als nicht ausgenommene. So wird nach einer unverzüglichen Kühlung ausgenommener Fische die Haltbarkeit von Dorschartigen mit 12 und von Forellen mit 9 bis 11 Tagen angegeben (SHEWAN und MURRAY, 1979; DAWOOD, 1986). Bei der Eislagerung von vollem und leerem Kaphecht stellten BURT et al. (1974) ab dem 5. Tag eine Verschlechterung der vollen Fische gegenüber den leeren Fischen fest. TOWNLEY und LANIER (1981) sowie BILINSKI et al. (1983) zeigten, dass sensorische Veränderungen durch unmittelbares Ausnehmen der Fische und ein konsequentes Kühlen nach dem Fang verzögert auftreten. Die aufgeführten

Untersuchungen würden die Notwendigkeit des Ausnehmens von Fischen belegen, um eine höhere Qualität und längere Haltbarkeit der Ware zu gewährleisten.

Andere Autoren hingegen beschreiben gegenteilige Ergebnisse. HANSEN (1963) zeigte, dass sowohl runde als auch ausgenommene Regenbogenforellen nach 9 Tagen die Verderbsgrenze unterschritten haben, ausgenommene aufgrund der oxidationsbedingten Verfärbungen und ranzigen Geruchsabweichungen der Bauchlappen, runde Fische aufgrund der Auflösungserscheinungen im Bauchraum. Von einem kaum bemerkbaren Einfluss des Ausnehmens auf die Haltbarkeit von gelagerten Fischen berichteten LUPIN et al. (1980), die zu dem Schluss kamen, dass nur bei ungenücherten Fischen ein Ausnehmen von Nutzen sein kann. Ähnlich geringfügig war der Unterschied bei eisgelagertem Wittling mit und ohne Niere mit einer Haltbarkeit von 14 bzw. 15 Tagen (MEYER und OEHLENSCHLÄGER, 1996). Nach MAIA et al. (1983) kann ein Ausnehmen der Fische auf keinen Fall die Lagerungsdauer verlängern. Ausgenommene Amerikanische Barbensalmmler (*Prochilodus scrofa*) hatten in ihrer Untersuchung sogar eine leicht höhere Tendenz zum Verderb als unausgenommene, diese Beobachtung war allerdings statistisch nicht signifikant. In einer weiteren Versuchsreihe wurde unausgenommen gelagerter Rotbarsch sowohl im Frischegrad als auch in der Kochprobe signifikant besser bewertet als ausgenommen gelagerter (OEHLENSCHLÄGER und REHBEIN, 2000). MEYER und OEHLENSCHLÄGER (1996) empfehlen, gegen Ende der Lagerzeit zur sicheren Ermittlung der Verzehrsfähigkeitsgrenze neben der Frischegradbestimmung nach der EU-Qualitätsklassifizierung auch eine Verkostung der gegarten Filetproben durchzuführen.

Bei der frühzeitigen Ablehnung runder Fische in den eigenen Untersuchungen spielte neben den Temperatureinflüssen der Füllungsgrad des Magen-Darm-Traktes eine wichtige Rolle. Bei der Gruppe der runden Forellen, die 24 Stunden vor der Schlachtung noch Futter erhielten, zeigten sich schon nach 2 Tagen stark fortgeschrittene Auflösungserscheinungen im Bauchraum, so dass sie etwa 7 Tage früher als die ausgenommenen und 5 Tage früher als die genücherten runden als nicht mehr verkehrsfähig eingestuft wurden. Bei den genücherten rund belassenen Fischen war der Verdauungskanal leer, Unterschiede zwischen leeren und runden Fischen traten erst nach 5 bis 8 Tagen auf. Auch AKSNES und BREKKEN (1988)

beobachteten während der Lagerung von unausgenommenen Lodden (*Mallotus villosus*) bei Fischen mit einem vollen Magen-Darm-Trakt eine schnellere Auflösung der Gewebestrukturen als bei Fischen mit ungefüllten Därmen. Eine mögliche Auswirkung von Fütterung auf die Haltbarkeit von Fischen wurde auch von LUPIN et al. (1980) untersucht. Bei nicht ausgenommenem Patagonischen Hecht (*Merluccius hubbsi*) konnte eine Eislagerzeit von 9 bis 10 Tagen im Sommer und von 14 bis 15 Tagen im Winter ermittelt werden. Die Autoren vermuten, dass dieser Unterschied zurückzuführen ist auf die verstärkte Nahrungsaufnahme nach dem Abbläichen im Sommer.

Vergleichbare Befunde in der Frischeklassenbestimmung lieferten auch die von der Forschungsgruppe an der Bundesforschungsanstalt für Fischerei in Hamburg durchgeführten Untersuchungen an unausgenommenen Seelachsen (BANNEKE et al., 2002). Seelachse, die während einer Fressphase gefangen worden waren, erreichten zum Teil bereits nach 6 bis 8 Tagen und damit etwa 7 Tage früher als die ausgenommenen Tiere wegen der Veränderungen im Bauchraum die Grenze der Verkehrsfähigkeit. Hingegen trat bei den nüchternen Seelachsen eines späteren Fangs über den gesamten Lagerungszeitraum hinweg keine signifikante Schlechterbewertung der runden Fische auf.

Einigen Fischarten, wie z.B. den Cypriniden fehlen die Magendrüsen, und der Oesophagus mündet direkt in den langen Darm, der bei pflanzenfressenden Arten das 15fache der Körperlänge erreichen kann (FIEDLER, 1991). In diesem Zusammenhang ist die Frage interessant, ob während einer Lagerung von runden Cypriniden post mortem Verderbsprozesse im Darm und die damit verbundene Möglichkeit eines Übertritts von Verdauungsenzymen und Bakterien in die umgebende Bauchhöhle und Bauchlappenmuskulatur anders verlaufen als bei den hier untersuchten und erwähnten Fischarten. Eine Untersuchung von KARL et al. (2001) zeigte jedoch, dass bei der Frischebewertung von genüchternen Schleien ausgenommene und unausgenommene Fische gleichermaßen nach 14 Tagen Lagerung die Grenze der Verkehrsfähigkeit erreichten und es zu keinem sichtbaren Übertritt von Verdauungsenzymen aus dem Darm in die Bauchhöhle kam, was zu einer Schlechterbewertung der runden Fische geführt hätte.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine Verkostung der Filets durch eine Kochprobe bei den Forellen der Herbstuntersuchungen 2000 und bei den Zandern durchgeführt. Durch dieses zusätzliche Verfahren konnten Aussagen hinsichtlich der Verwendbarkeit des verzehrsfähigen Anteils, d.h. der Filets gemacht werden. Sowohl bei der Verkostung der Forellen- als auch der Zanderfilets waren die Bewertungen der Filets runder und ausgenommener Fische über den gesamten Untersuchungszeitraum nahezu gleich, ein schnellerer Qualitätsverlust runder Fische konnte nicht festgestellt werden. Eine Ausnahme bildeten Proben der gefütterten Forellen, deren Bauchhöhlen weit fortgeschrittene Autolyseerscheinungen zeigten und in der Frischegradbeurteilung bereits frühzeitig abgelehnt wurden. In der Blindverkostung wurden sie am 7. Lagerungstag im Vergleich zu den Filets ausgenommener Fische zwar schlechter bewertet, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Auch bei ausgenommenen und unausgenommenen Schleien ergab die sensorische Bewertung der gegarten Filetproben auch nach 14 Tagen beim Erreichen der durch die Frischegradbestimmung ermittelten Verkehrsfähigkeitsgrenze keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Keine Gruppe hatte bei Beendigung des Versuchs die Grenze der Verzehrsfähigkeit erreicht (KARL et al., 2001). Hingegen fanden RODRIGUEZ et al. (1999) bei den sensorischen Merkmalen von ausgenommenen und runden Regenbogenforellen Unterschiede. Eine inakzeptable Trockenheit und Bitterkeit der Filets runder Forellen trat einen Tag früher auf als bei unausgenommenen.

Auch bei einigen anderen in der Bundesforschungsanstalt für Fischerei untersuchten Seefischarten wie Schellfisch und Seelachs wurden in der Kochprobe der Filets die runden Fische schlechter bewertet als die ausgenommenen (BANNEKE et al., 2002). Bei diesen Fischen traten nach 2 bis 7 Tagen Fehlgerüche der gegarten Filets auf, und nach 5 bis 10 Tagen fielen der Geruch und später auch der Geschmack bei rund belassenen Tieren signifikant gegenüber den ausgenommenen ab, so dass die Verzehrsgrenze 1 bis 4 Tage früher erreicht wurde. Dies deckt sich mit Angaben über Kabeljau und verwandte Arten, jedoch nicht mit Seehecht, für den eine übereinstimmende Bewertung der Filets leerer und runder Fische beschrieben ist (Huss, 1995).

Eine ungewöhnlich lange Eislagerzeit von 21 Tagen bis zum Erreichen der Verzehrsfähigkeitsgrenze wurde bei ausgenommenen tropischen Buntbarschen aus einer Aquakultur durch die Untersuchung der gegarten Filetproben ermittelt

(MANTHEY und KARL, 1984). Diese Fische waren deutlich länger haltbar als See- und einheimische Süßwasserfische.

Zwischen den Fischarten zeigen sich gravierende Unterschiede hinsichtlich der Art und des zeitlichen Auftretens von Verderberscheinungen, die durch sensorische Methoden erfassbar sind. Vor allem bei rund gelagerten Seefischen kommt es zu deutlichen Qualitätsverlusten im Laufe der Lagerung aufgrund der unangenehmen Fehlgerüche der Leibeshöhle, die sich bei längerer Lagerzeit auf die Rückenmuskulatur übertragen können. Bei Süßwasserfischen kann lediglich von einer kaum erkennbaren nachteiligen Beeinflussung der Filetqualität runder Fische ausgegangen werden. In der vorliegenden Untersuchung ergab sich lediglich bei der Blindverkostung der Filets genüchterter und gefütterter Forellen ein Unterschied. Die Bewertung aller gefütterten Fische fiel schlechter aus als die der ausreichend vor der Schlachtung genüchterten.

### **5.3.2 Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen, Verlauf von GKZ, SSO und Pseudomonaden**

Während der Eislagerung kam es bei Regenbogenforellen und Zandern zu einer Vermehrung der Keime auf der Haut, in der Filet- und Bauchlappenmuskulatur und im Darm. Die oberflächliche Keimvermehrung zeigte keine Unterschiede zwischen ausgenommenen und runden Fischen. Die Anfangskeimgehalte auf der Haut sind vergleichbar mit Ergebnissen zahlreicher anderer Studien mit Süß- und Salzwasserfischen, bei denen auf fangfrischen Fischen Gesamtkeimzahlen von log 3 bis log 5 KbE/cm<sup>2</sup> gezählt wurden (HORSLEY, 1973; ABO-ELNAGA, 1980; ACUFF et al., 1984; SCOTT et al., 1992; ABABOUC, 1996). Im Winter als auch im Sommer lagen sie bei den Forellen im Schnitt bei log 3,7 KbE/cm<sup>2</sup> und bei den Zandern bei log 4,5 KbE/cm<sup>2</sup>. Bis zum Ende der Lagerung am 13. bzw. 15. Tag wurden bei den Sommerforellen zwei Tage vor den Winterforellen Werte zwischen log 6 und 7 KbE/cm<sup>2</sup> erreicht, auf der Haut der Zander im Schnitt log 8,5 KbE/cm<sup>2</sup>. Runde und ungewaschene Zander erreichten vom gleichen Ausgangspunkt ausgehend am Tag 7 eine signifikant höhere Keimzahl als die ausgenommenen und gewaschenen Fische. Hier könnte durch das Waschen der ausgenommenen Gruppe ein verzögernder Effekt auf die bakterielle Vermehrung ausgeübt worden sein, denn am

Ende der Lagerung ergaben sich für beide Gruppen wieder vergleichbare Keimzahlen. Werte um log 8 auf der Haut von Süß- und Salzwasserfischen gegen Ende der Lagerungsfähigkeit wurden auch von anderen Untersucherguppen festgestellt (SCOTT et al., 1986; RYDER et al., 1993).

Auf der Haut der Winterforellen kam es wie auch auf der Haut und den Bauchlappen der ausgenommenen Sommerforellen zu einer, auch von anderen Autoren beschriebenen anfänglichen Verzögerung im Wachstum der Gesamtkeimzahlen (JØRGENSEN et al., 1988; ACUFF et al., 1983; RYDER et al., 1993). Die Keimzahlen sanken leicht in den ersten Tagen während der Lag-Phase, bevor es zum exponentiellen Wachstum bis zum Ende der Lagerzeit kam. Grund für das anfängliche Absterben der Keime könnte das Absinken der Temperaturen von 5-10°C im Winter und 15°C im Sommer im Beckenwasser der Anlage auf 0-1°C im Eis während der Lagerung sein. Bei einem derartigen Temperaturabfall wird die mesophile Flora in ihrer metabolischen Aktivität gehemmt, und es kommt zu einem Ansteigen der psychrotrophen Flora (DAWOOD et al., 1986). Bei den Zandern wurde dieser Verlauf nicht beobachtet.

Wie in der Literatur nachzulesen ist, bilden in erster Linie *Pseudomonas* spp. und *Shewanella putrefaciens* die spezifische Verderbsflora in Fischgewebe. So isolierten z.B. STENSTRÖM und MOLIN (1990) 159 gramnegative Stämme von aus dem Handel stammenden Seefischen, wovon 46 % Pseudomonaden und 38 % *Shewanella putrefaciens* waren. Bei den Regenbogenforellen und den Zandern der vorliegenden Untersuchung lagen auf der Haut und in der Fischmuskulatur die Werte der spezifischen Verderbskeime, zu denen die Pseudomonaden und bei den Zandern in erster Linie *Shewanella putrefaciens* zählen, eine halbe bis eine ganze Zehnerpotenz unter denen der aeroben Gesamtkeimzahl. Eine ähnliche Vermehrung von Keimen auf der Haut von eisgelagertem Wittling (*Merlangius merlangus*) stellten auch MEYER und OEHLENSCHLÄGER (1996) fest. Sie zählten auf der Haut am ersten Tag der Lagerung eine Keimzahl von log 3 KbE/cm<sup>2</sup>, am Tag 15 log 7 bis 8 KbE/cm<sup>2</sup>. Verderbskeime wurden auf der Haut fangfrischer Fische nicht gefunden, sie waren erst ab dem 3. bis 4. Lagertag nachweisbar und erreichten am 15. Tag mit log 7 KbE/cm<sup>2</sup> etwas niedrigere Werte als die Gesamtkeimzahlen. Dabei korrelierte die Zahl der Verderbskeime auf der Haut signifikant mit der Lagerzeit in Eis, so dass die Autoren daraufhin vorschlugen, bei einer sachgerechten Eislagerung die Zahl an

Verderbskeimen auf der Haut als Frische- bzw. Verderbparameter zu benutzen. Eine gegensätzliche Position nehmen RYDER et al. ein (1993). Sie stellten zwar fest, dass eine oberflächliche Keimzahl auf Langschwanz-Seehecht (*Macruronus novaezelandiae*) von  $\log 7$  KbE/cm<sup>2</sup> am Ende der Lagerung nach 11 Tagen mit Verderbsgeruch und -geschmack zusammenfiel, kamen jedoch zu dem Schluss, dass aufgrund von Waschtechniken oder durch ein Abspülen von Bakterien durch schmelzendes Eis die Bestimmung der oberflächlichen Keimzahl nicht als Indikator für die Frische empfohlen werden sollte.

Im Darm wurde der aerobe Gesamtkeimgehalt und der Gehalt an spezifischen Verderbniserregern bei der Zanderuntersuchung und bei den Sommerforellen 2001 bestimmt. Parallele aerobe und anaerobe Bebrütungen von PC-Agar zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl zeigten bei Darmproben keine Bedingungen, die selektiv das Wachstum von Anaerobiern fördern würden. Bei den Sommerforellen entwickelten sich die Darmkeimzahlen von einem Ausgangswert von im Schnitt  $\log 4,2$  KbE/g über  $\log 5$  bis  $6$  nach einer Woche auf Werte höher als  $\log 7$  KbE/g nach 14 Tagen und lagen somit von Anfang an über den Keimzahlen des Futters und des Umgebungswassers (Stichprobe aus der Futtercharge  $\log 3,87$  KbE/g, Wasserprobe aus dem Forellenbecken  $\log 3,9$  KbE/ml). Eine große Streubreite innerhalb einer Stichprobe an den einzelnen Untersuchungstagen zeigte starke individuelle Schwankungen von Fisch zu Fisch trotz identischer Haltungsbedingungen und Fütterung. Die Keimzahlen im Darm genüchterter Forellen lagen ca. eine halbe Zehnerpotenz über den ermittelten Darmkeimzahlen der gefütterten Fische des zweiten Durchganges.

Auch NEDOLUHA und WESTHOFF (1993) wiesen z.T. bei mit Futter gefüllten Fischdärmen von Felsenbarsch (*Morone saxatilis*) niedrigere Keimzahlen nach als bei leeren Därmen. Sie zählten Keimzahlen von  $4,7 \cdot 10^6$  bis  $4,7 \cdot 10^9$  KbE/g im Darm, wobei die Fische mit Keimzahlen  $> 10^9$  KbE/g nur einen geringen Anteil an mukoider Substanz im Darm enthielten, im Gegensatz zu den Fischen mit niedrigeren Darmkeimzahlen, deren Darm mit angedautem Futter gefüllt war. TRUST und SPARROW (1974) untersuchten ebenfalls Gewebe des Magen-Darm-Traktes und den Darminhalt und stellten fest, dass die mit dem Darmgewebe assoziierten Keimzahlen höher waren als die Keimzahlen des Darminhaltes.

Im Vergleich zu den Forellen wurden im Darm von Zandern etwas niedrigere Keimzahlen gezählt. Nach einer anfänglichen Keimzahl von log 2,8 KbE/g mit einer starken Streuung innerhalb der Stichprobe von 30 % vermehrten sich die Keime in der ersten Woche nur wenig und lagen am Tag 11 bei ca. log 5 KbE/g. Im Hinblick auf gesundheitliche Aspekte sind Werte dieser Größenordnung eher niedrig, und die nur sehr langsame Vermehrung der Keime im Darm in den ersten Tagen stellt somit kein Risiko bei unausgenommenen und konsequent gekühlten Fischen dar. GONZALEZ et al. (1999) verglichen die Darmkeimzahlen von wild lebenden Meerforellen (*Salmo trutta*) und Hecht (*Esox lucius*) und von in Aquakultur gezüchteten Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und stellten bei den wilden Meerforellen mit log 6,7 KbE/g die höchsten und bei gezüchteten Regenbogenforellen mit log 3,8 KbE/g die niedrigsten aeroben Keimzahlen fest, während die Keimgehalte des umgebenden Gewässers 3 Log-Stufen niedriger waren. Auch die Zusammensetzung der Keimflora des Darmes unterschied sich von der des Wassers, so dass die Autoren daraus schlossen, dass der Darm für einige Bakterien eine bevorzugte ökologische Nische darstellt (WESTERDAHL et al., 1991) und dass Umweltkeime keinen so großen Einfluss auf die Menge und Art der Flora im Fischdarm haben, wie im allgemeinen angenommen wird (HUSS, 1995; ICMSF, 1998). Ebenso weisen auch zahlreiche andere Literaturangaben bei Süßwasserfischen (Tilapia (*Tilapia aurea*), Felsenbarsch (*Morone saxatilis*), Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idellus*), Wels (*Ictalurus punctatus*), Regenbogenforelle) auf Darmkeimzahlen von log 4 bis log 7,5 KbE/g hin (TRUST und SPARROW, 1974; ACUFF et al., 1984; WEMPE und DAVIDSON, 1992; GRAM und HUSS, 1996; NEDOHULA und WESTHOFF, 1993, 1997). Bei einer Untersuchung von LEUNG et al. (1992) wurde eine psychrotrophe Keimzahl von log 7,25 KbE/g im Darm von Wels gezählt, log 4,20 KbE/g waren Aeromonaden. Die zur gleichen Zeit untersuchte psychrotrophe Keimzahl im Umgebungswasser und im Sediment des Teiches betrug log 0,78 bzw. log 3,49 KbE/ml oder g.

Eine Schwierigkeit der Feststellung der Darmflora bei Fischen stellt die Unterscheidung der autochthonen von den allochthonen Mikroorganismen dar. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten RINGØ et al. (2001) zeigen, dass im Darm von Saibling (*Salvelinus alpinus*) die autochthone bakterielle Flora aus stäbchenförmigen und ovoiden Bakterien besteht, die im Darmepithelgewebe in den



Spitzen der Darmmikrovilli sitzen. Nach Meinung der Autoren werden durch herkömmliche kulturelle Methoden wie Homogenisieren und Ausstreichen von Darmmaterial und -inhalt auf Selektivmedien nur die Mikroorganismen erfasst, die auf den spezifischen Selektivmedien wachsen können. Ein großer Anteil der Darmflora bliebe somit unerkannt, da angenommen wird, dass nur 3 % der gesamten Flora kulturell nachweisbar ist. Zu dieser Aussage kamen schon 1974 TRUST und SPARROW in ihrer Untersuchung des Magen-Darm-Traktes von Süßwasser-Salmoniden.

Der Vergleich der mikrobiellen Belastung der Bauchlappenmuskulatur von rund und ausgenommen gelagerten Fischen machte deutlich, dass ein frühzeitiges Ausnehmen insbesondere dann, wenn ausreichende hygienische Bedingungen während der Schlachtung nicht gewährleistet werden können, für die bakterielle Qualität des Fisches nicht von Vorteil ist. Trotz einer Vermehrung der Keime im Darm von rund gelagerten Fischen konnte eine Besiedlung und ein starkes Wachstum von Keimen in der Bauchhöhle nicht beobachtet werden. Die Bauchlappen der runden Forellen blieben in der ersten Woche der Lagerung steril, teilweise auch bis zum Lagerungsende. Dabei blieb die bakterielle Kontamination der Bauchhöhle runder Fische auch dann signifikant niedriger als bei den leeren, wenn bereits starke autolytische Abbauprozesse der Bauchhöhlenorgane und der Bauchwand auftraten, was v.a. bei den gefütterten Fischen der Fall war. Hingegen zeigten HERBORG und VILLADSEN (1975), dass eine Nüchterung von Regenbogenforellen vor der Schlachtung die Geschwindigkeit der bakteriellen Besiedlung des Gewebes verzögerte. Als frühesten Zeitpunkt der histologisch feststellbaren Penetration des Peritoneums durch Darmbakterien wurde von SHEWAN & MURRAY (1979) 72 Stunden post mortem angegeben.

Ein genauer Zeitpunkt des möglichen Übertritts von Darmkeimen auf das Peritoneum und in die Eingeweide umschließende Bauchlappenmuskulatur konnte in den eigenen Versuchen nicht festgestellt werden, da die Zahl der mit Keimen kontaminierten Bauchlappenmuskelpuben während der gesamten Lagerungsdauer zwischen 0 und 4 von 10 Proben schwankte. Erst ab dem Lagerungstag 8 waren im zweiten Durchgang der Sommerforellen 3 bis 4 von 10 Bauchlappen gering kontaminiert. Die Keimzahlen lagen unterhalb der Quantifizierungsgrenze von  $\log 3,3$  KbE/g, beim dritten Durchgang zum Teil noch unterhalb der hier angewandten Nachweisgrenze von  $\log 1,6$  KbE/g der MPN-Methode.

Das Ausnehmen der Forellen unter optimalen Hygienebedingungen (Spülen mit Trinkwasser) führte zu Beginn der Lagerung mit log 2,1 KbE/g zu einer geringen Kontamination der Bauchlappen. Die Keimzahlen blieben in der ersten Woche auf dem gleichen Niveau, stiegen am Ende der Lagerung nach 9 Tagen auf den durchschnittlichen Wert von log 4,2 KbE/g an. Bei einer schlechten Schlachthygiene (Spülen mit verschmutztem Beckenwasser der Anlage) waren die Keimzahlen auf den Bauchlappen der leeren Fische mit durchschnittlich log 4,8 KbE/cm<sup>2</sup> bereits unmittelbar nach der Schlachtung höher als die Keimzahlen auf der Haut (log 3,75 KbE/cm<sup>2</sup>). Mit im Schnitt log 6,5 KbE/g nach 13 Tagen Lagerung war der Eintrag von Keimen durch das Bearbeiten höher als die sich auf natürliche Weise entwickelnde Keimflora auf der Haut der Fische. Diese Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit von hygienisch einwandfreien Schlachten und Ausnehmen. In vielen Fischanlagen, insbesondere bei den Teichwirtschaften ist jedoch ein Auswaschen der ausgenommenen Fische mit Leitungswasser aufgrund des fehlenden Trinkwasseranschlusses am Teich schlecht durchführbar.

Vergleichbare Ergebnisse traten auch bei den tropischen Fischen und beim Rotbarsch (*Sebastes marinus/mentella*) auf (LAGRANGE, 2002). Darmproben von Zackenbarsch (*Myctoperca rubra*) wiesen bereits beim Eintreffen im Institut extrem hohe Keimzahlen von log 7 KbE/g auf, nach 12 Tagen Lagerung wurden jedoch in der Bauchhöhle runder Fische nur log 2,7 KbE/g gezählt. Auch kam es bei ausgenommen gelagerten Rotbarschen zu einem Keimanstieg auf den Bauchlappen von log 3,5 auf log 7,0 KbE/g nach 17 Tagen, bei rund belassenen hingegen nur auf log 4,5 KbE/g. Weiterhin zeigten WEDEKIND und SCHRECKENBACH (1996) bei der Lagerung von ausgenommenen Forellen (*Oncorhynchus mykiss*) und Plötzen (*Rutilus rutilus*) bei erhöhter Lagerungstemperatur, dass sich die bakterielle Belastung des Bauchfells innerhalb von 4 Stunden stark erhöhte, während bei den rund belassenen Fischen die Keimzahlen auf dem Bauchfell niedrig waren. Auch in kanadischen und amerikanischen Untersuchungen der 50er Jahre an Schellfisch waren bei rund gelagerten Fischen deutlich geringere Belastungen feststellbar als bei ausgenommenen (BRAMSNAES, 1954).

Demnach hat ein frühzeitiges Ausnehmen von Fischen keinen positiven Einfluss auf den mikrobiologischen Status der Fischmuskulatur, insbesondere dann nicht, wenn

einwandfreie Bedingungen während der Schlachtung nicht gewährleistet werden können. Bei den runden Fischen führten die aus dem sich zersetzenden Magen-Darm-Trakt übertretenden Verdauungsreste und Enzyme zu keiner schnelleren bakteriellen Besiedlung der umgebenden Muskulatur. Eine Ursache für die späte und nur relativ geringe Besiedlung der Bauchhöhle runder Fische mit Darmkeimen ist offen. Möglich sind bakteriostatische oder bakterizide Wirkungen von Darminhaltstoffen. Immunmechanismen von Fischen, insbesondere im Darm, und die chemisch-physikalischen Bedingungen in der Bauchhöhle runder Fische während der Lagerung sind nur unzureichend erforscht. Unspezifische Wirkungen der aggressiven Verdauungsenzyme und Gallensäuren, die in die Bauchhöhle übertreten und Darmbakterien an der Ausbreitung auf dem Bauchfell hindern, könnten durchaus einen wachstumshemmenden Effekt gehabt haben. In den Körper-, Gewebs- und Zellflüssigkeiten (z.B. Schleim, Eier, Sperma, Serum) sind bei Fischen nicht-spezifische humorale Abwehrfaktoren vorhanden (SCHRECKENBACH, 1990). Diese bilden eine Abwehrbarriere gegenüber Viren, Bakterien und Pilzen und wirken unabhängig von den spezifischen Abwehrmechanismen.

Im allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Rückenmuskulatur fangfrischer Fische steril ist (SHEWAN, 1971; LISTON, 1980; MEYER und OEHLENSCHLÄGER, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden aus dem Rückenfilet stammende Muskelproben bei Regenbogenforellen im Winter 1999 und bei den Zandern untersucht, im Sommer 2001 nur Muskelproben aus den Bauchlappen von Forellen. Zwischen Rückenmuskelproben von ausgenommenen und rund gelagerten Fischen wurden keine signifikanten Unterschiede in der mikrobiellen Belastung festgestellt. Zu dieser Aussage kamen auch SCOTT et al. (1986) bei der Untersuchung von Kaiserbarsch (*Hoplostethus atlanticus*), wonach ein Ausnehmen der Fische nicht zu einer Verringerung der Keimzahl in der Muskulatur im Vergleich zu unausgenommen gelagerten Fischen führte. In den Filetproben der Regenbogenforellen lagen die Werte bis zum 7. Tag knapp unter- bzw. oberhalb der Quantifizierungsgrenze von log 3 KbE/g, erst ab Tag 10 erhöhten sich die Keimzahlen zum Teil auf log 4 KbE/g. In der Rückenmuskulatur bei Zandern waren noch geringere Keimzahlen feststellbar, die Muskulatur blieb fast bis zum Ende der Lagerung steril. Erst ab dem 7. Tag waren einige Proben gering belastet, jedoch immer nur 1 bis 4 von 5 Proben pro Stichprobe. Die niedrigeren Keimzahlen in der Rückenmuskulatur von Zandern im

Vergleich zu den Regenbogenforellen könnten in der stärkeren Festigkeit und Dicke der Haut oder der oberflächlichen Schleimbeschaffenheit begründet liegen, die erschwerend auf ein Eindringen von Keimen wirken können.

Die geringgradige und spät auftretende Besiedlung der Muskulatur deckt sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen. So wiesen SHEWAN und MURRAY (1979) in der Muskulatur von Kabeljau bei Eislagerung mikroskopisch erst nach 12 - 14 Tagen Bakterien nach. Auch MEYER und OEHLenschLÄGER (1996) zeigten in der Filetmuskulatur von eisgelagerten Wittling bis zum 5. Lagertag eine Sterilität. Bei Untersuchungen an anderen Fischarten blieb die Muskulatur von z.B. Schleien und Schollen bis zum 11. Tag steril, bei Rotbarsch und Red Snapper bis zum 9. bzw. 10. Tag (KARL et al., 2001; BANNEKE et al. 2002; LAGRANGE, 2002). Hingegen fanden andere Untersucher zum Teil auch bei fangfrischen Fischen Keime in der Muskulatur. So zählten JØRGENSEN et al. (1988) im Muskelgewebe von ausgenommenen Kabeljau (*Gadus morhua*) Anfangskeimgehalte an H<sub>2</sub>S-produzierenden Bakterien von log 1,4 bis 3,7 KbE/g, die Endkeimgehalte lagen am Ende der sensorisch bestimmten Lagerfähigkeit nach im Schnitt 14 Tagen entsprechend hoch. Eine höhere Anfangskeimbelastung in der Rückenmuskulatur mit Werten zwischen log 4 und log 5 KbE/g ermittelten bei Seezunge bzw. bei Renken (*Coregenus* sp.) auch ADAMS et al. (1964) und ARIK et al. (2001).

Die vorliegenden Ergebnisse der am Projekt beteiligten Arbeitsgruppen zeigen, dass erstens die mikrobielle Belastung der Filets äußerst gering ist und zweitens eine systematische Einwanderung von Keimen aus dem Darm unausgenommen gelagerter Fische in die Filetmuskulatur ausgeschlossen werden kann. Somit besteht für den Verbraucher kein erhöhtes Risiko beim Verzehr von Filetmuskulatur unausgenommener Fische.

### **5.3.3 Entwicklung der Keimzahlen der unterschiedlichen mikrobiologischen Taxa**

Clostridien bilden einen Teil der natürlichen Mikroflora des Fisches und kommen vor allem im Magen-Darm-Kanal vor. Hier werden zum Teil hohe Konzentrationen erreicht, so dass eine Kontamination des Fisches durch die Ausscheidung seines Kotes ins Wasser möglich sein kann (SKOVGAARD, 1979).

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei den Regenbogenforellen die Methode der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 zum Nachweis von mesophilen sulfitreduzierenden Clostridien verwendet. Diese wachsen anaerob, können Wachstumsmedien trüben und schwärzen und bilden Gas. Der bei Fischen weit verbreitete Typ E von *Clostridium botulinum* bildet kein H<sub>2</sub>S (keine Schwärzung) und wird mit dieser Methode nicht erfasst. Bei Regenbogenforellen wurden Clostridien weder in der Rückenmuskulatur noch in der Muskulatur der Bauchlappen gefunden, obwohl hier das Risiko eines Übertritts von Mikroorganismen aus dem Darm besonders groß ist. Auch hier war wie bei den Gesamtkeimzahlen kein Übertritt von Keimen des Magen-Darm-Traktes in die umgebende Muskulatur erkennbar.

Bisher wurde von einem Nachweis von *Clostridium botulinum* im Bodenschlamm und Teichwasser, im Magen-Darm-Trakt und auf der Hautoberfläche von Fischen mit Kontaminationsraten von 5-100 % vor allem in Erdteichen mit großer Wassertiefe berichtet (BACH et al., 1971; HUSS et al., 1974; CANN et al., 1975; HYYTIÄ et al., 1998; HYYTIÄ-TREES et al., 1999). Da Clostridien vor allen Dingen im Schlamm der Teichwirtschaften vorkommen (WENZEL et al., 1971), kann durch die Nutzung von Kunststoff- oder Betonbecken die Gefahr einer Clostridienkontamination der Fische erheblich gesenkt werden. Auch dies könnte ein Grund sein, dass bei den untersuchten Regenbogenforellen, die in einer Rinnenanlage mit Betonbecken gehalten wurden, keine Clostridien nachweisbar waren.

Bei Untersuchungen von Darm- und Bauchlappentupferproben von Zandern wurden Clostridien-verdächtige Proben durch eine Anreicherung ermittelt. Isolate, die aus der Anreicherung mit Gasbildung, Trübung und/oder Schwärzung des Mediums gewonnen wurden und bei der darauf folgenden Subkultivierung auf festen Medien ausschließlich anaerob wuchsen, katalase-negativ und grampositiv waren sowie eine erkennbare Sporenbildung zeigten, wurden als Clostridien angesehen. Bei keiner der 30 Darm- und 30 Bauchlappentupferproben der insgesamt 15 untersuchten rund gelagerten Zandern wurden sämtliche Kriterien erfüllt. Da keine ausreichende Unterdrückung anderer, fakultativ wie obligat anaerober Keime erfolgte, erwies sich die Methode als unsicher und als sehr arbeitsaufwändig. Viele in der Fischumgebung häufigen und für den Menschen harmlosen aeroben Bazillenarten bilden außerdem Sporen, die sich im mikroskopischen Bild nicht von den Clostridien unterscheiden. Sie zeigen zudem ähnliche Reaktionen wie die Clostridien, sind je nach

Wachstumsverhältnissen variabel in ihrem Gramverhalten und in ihrer Katalaseaktivität, wachsen jedoch auch anaerob.

Für eine weitere Klärung und den Nachweis des Toxingens von *Cl. botulinum* Typ E wäre eine PCR notwendig gewesen, die aber im Rahmen des Forschungsvorhabens weder zeitlich noch finanziell zu rechtfertigen gewesen war. Die Frage, ob eine Lagerung von unausgenommenen Fischen das Risiko der Bildung von Botulinumtoxin erhöht, bleibt weiterhin nach unseren Ergebnissen offen. Für das mögliche Vorhandensein von Clostridien wurden nur indirekte Anhaltspunkte gefunden. Bei der aeroben Lagerung von Frischfisch spielt *Cl. botulinum* keine Rolle, da der Fisch bereits sensorisch verdorben ist, bevor sich das Neurotoxin des Typ E im Darm entwickelt hat und in das umliegende Gewebe übertritt (EKLUND, 1992). Zwar kann es bei nichtproteolytischen Stämmen unter idealen Bedingungen bis 3,3°C (38° Fahrenheit) Lagertemperatur zu einem langsamen Wachstum kommen, sie stehen aber im Fischkörper in Konkurrenz zur psychrophilen Flora. Erst wenn die Verderbsflora in ihrem Wachstum gehemmt und damit die Lagerungsdauer der Fische verlängert wird, kann das im Darm vorhandene Reservoir an Sporen ein erhöhtes Risiko bei unausgenommen gelagerten Fischen bedingen.

Listerien wurden bei den Untersuchungen an Regenbogenforellen im Winter 1999 in allen 4 Versuchsdurchgängen auf Regenbogenforellen qualitativ nachgewiesen. Da auch auf den beim Ausnehmen verwendeten Werkzeugen und in Wasser- und Umgebungsproben Listerien gefunden wurden, erscheint eine Kontamination der Fische beim Schlachten, Ausnehmen und Waschen mit Beckenwasser als sehr wahrscheinlich. Bei den im Sommer 2001 beprobten Forellen aus der selben Anlage ließen sich keine Listerien nachweisen.

Alle Isolate wurden als *Listeria innocua* identifiziert, *L. monocytogenes* wurde in der Fischpopulation nicht nachgewiesen. Auch MIETTINEN et al. (2001) fanden in Proben von rohem Fisch und Fischprodukten in einem fischverarbeitendem Betrieb zweimal so häufig *L. innocua* wie den humanpathogenen Vertreter *L. monocytogenes*. In den eigenen Versuchen lagen bei einem zusätzlichen quantitativen Listeriennachweis alle Werte unterhalb der Nachweisgrenze von 100 KbE/g; die Anzahl positiver Haut- und Muskelproben verringerte sich im Laufe der Lagerung. Bei einem Fisch, der bei der Eingangsuntersuchung quantitativ keine Listerien aufwies, wurde nach 15 Tagen

Lagerung im Muskelgewebe eine Keimzahl von 100 KbE/g gezählt, so dass man eine Vermehrung von Listerien während einer Eislagerung nicht ausschließen kann. Dieses Ergebnis kann jedoch auch auf eine ungleichmäßige Verteilung der Keime innerhalb der Fischmuskulatur zurückzuführen sein.

Eine Vermehrung von Listerien auf Fischprodukten, insbesondere auf geräucherten Produkten während der Lagerung bei Kühlschranktemperaturen stellte FARBER (1991) fest. Er untersuchte mit *L. monocytogenes* beimpften geräucherten Lachs und diagnostizierte nach 14 Tagen Lagerung der Proben bei + 4°C eine Vermehrung der Organismen um 2 bis 3 Logstufen. Diese Untersuchung ist jedoch nicht ohne Einschränkungen mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar, einerseits, weil die Temperatur um 4°C höher lag und andererseits, da Räucherfische aufgrund einer künstlich unterdrückten Begleitflora andere Wachstumsbedingungen für Listerien bieten als Rohfische. Auch JEMMI (1990) fand in geräucherten und fermentierten Fischen *L. monocytogenes* und kam zu dem Schluss, dass Listerien, die sich auch schon auf dem Rohfisch befanden, überleben konnten. So isolierten GUYER und JEMMI (1990) in einer weiteren Untersuchung bei der Hälfte der Rohlachsproben *Listeria* spp. HUSS et al. (2000) nehmen an, dass es schwierig ist zu definieren, ob Listerien natürlicherweise auf rohem Fisch vorkommen oder ob die Kontamination während der Verarbeitung oder danach erfolgt, und ob der Ausgangswert auf rohem Material für die weitere Vermehrung ausschlaggebend ist. EKLUND und Mitarbeiter (1995), die *L. monocytogenes* im Schleim, auf der Haut und in der Bauchhöhle von Lachs gefunden hatten, gehen davon aus, dass für die Dekontamination und Eliminierung von *L. monocytogenes* vom Rohfisch zwar eine gründliche Reinigung und Desinfektion ausreichend ist, eine Rekontamination jedoch kann durch weitere Verarbeitungsschritte oder durch die verwendeten Geräte wieder erfolgen. Eine verbesserte Produktionshygiene und konsequente Reinigung und Desinfektion der verwendeten Geräte und der gesamten Zucht- und Produktionsanlagen könnte die Keimbelastung der Fische verringern.

Der *Vibrio*-Nachweis auf der Haut von Zandern durch die Tupferprobe verlief negativ. Keines der als verdächtig eingestuften Isolate zeigte in der biochemischen Differenzierung die charakteristischen Merkmale. Grund hierfür könnte die niedrige Wassertemperatur zum Fangzeitpunkt im Januar gewesen sein. Vibrionen treten vermehrt bei Wassertemperaturen über 15°C auf und sind deshalb während der

warmen Sommermonate gehäuft in Oberflächenwasser, in den Mündungstrichtern großer Flüsse und in Küstengebieten anzutreffen (BOCKEMÜHL, 1992; STROM und PARANJPYE, 2000). BOCKEMÜHL et al. (1986) konnte bei Untersuchungen von Wasserproben aus der Elbe zu verschiedenen Jahreszeiten zeigen, dass ein Temperaturanstieg über 10 bis 20°C eindeutig mit einem Ansteigen der Vibrionenzahlen auf Höchstwerte von 10<sup>2</sup> KbE/Liter korrelierte.

Aufgrund des belegten Vorkommens zumindest von *V. vulnificus* in Ostsee-Küstengewässern (HOYER, 1996), kann ein Risiko bei den aus der Ostsee stammenden Zandern der vorliegenden Untersuchungen nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Zudem kann dieser Keim bei Temperaturen unterhalb von + 10°C den sogenannten "viable but non-culturable – Status" ausbilden, so dass ein kultureller Nachweis nicht möglich ist (BRYAN et al., 1999; OLIVER, 1995). Nach den vorliegenden Untersuchungen bleibt die Frage offen, ob Untersuchungen an Ostseezander in den Sommermonaten einen Vibrionennachweis ergeben hätten.

Der Nachweis von Aeromonaden gestaltete sich sehr aufwändig und unsicher, da eine Abgrenzung gegen andere Bakterien nur mit großen Schwierigkeiten möglich war. Bei der Eingangsuntersuchung der Haut von Zandern auf Aeromonaden erwiesen sich rund ein Drittel der Isolate auf Ryan-Agar definitiv nicht als *Aeromonas* spp. und konnten auch mit Hilfe des API-Systems keiner Spezies zugeordnet werden. Es könnte sich um *Enterobacteriaceae* gehandelt haben.

Wie bei den Zandern spielten bei den Winterforellen Aeromonaden eine geringe Rolle. Sie konnten nur im ersten der insgesamt 4 Versuchsdurchgänge ab dem 10. Tag nachgewiesen werden. *A. ichthiosmia* bildete den größten Anteil der insgesamt 66 als verdächtig abgenommenen Kolonien, 4 wurden als der für den Menschen fakultativ pathogene *A. hydrophila* bestätigt. Der Grund für die schlechte Identifizierung kann ein Überwuchern der Zielkeime durch die Konkurrenzflora auf dem wenig selektiven Ryan-Medium gewesen sein. Auch niedrigere Wassertemperaturen in den Monaten Oktober bis Dezember könnten einen Einfluss auf die Vermehrungsfähigkeit von Aeromonaden gehabt haben. Beim Verderb von Süßwasserfischen berichten andere Autoren von Aeromonaden als Hauptverderbskeime, jedoch handelte es sich dabei um Lagerungsbedingungen bei höheren Temperaturen (GORCZYCA et al., 1985; LEN, 1987; HASSAN et al., 1994). GRAM et al. (1990) identifizierten Aeromonaden als spezifische Verderbskeime beim



mesophilen Verderb von Nilhecht (*Lates niloticus*). Wurden die Fische allerdings bei niedrigeren Temperaturen gelagert, ermittelten die Untersucher bei Nilhecht überwiegend Pseudomonaden, die andere Arten verdrängten.

Wie bereits in Kapitel 5.2.2 diskutiert, wurde bei der Berechnung der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen von einem Maximalwert ausgegangen, bei dem einige der vermutlich oxidase-positiven Keime aufgrund der Undurchführbarkeit des Oxidasetests bei sämtlichen gewachsenen Kolonien mit gezählt wurden. Bei den Zandern erwiesen sich die Keimzahlen auf der Haut und in Darmproben mit Werten unterhalb von 1,7 MPN/g bzw. cm<sup>2</sup> als sehr gering.

Die höchsten *Enterobacteriaceae*-Werte wurden im Darm der Aquakulturforellen im Sommer 2001 gezählt. Die Keimzahlen stiegen kontinuierlich bis zum Ende der Lagerungsfähigkeit am Tag 11 auf log 5,6 KbE/g an. Auf der Haut lagen die Keimzahlen mit 0,5 bis 1 Logstufen unter den Darmkeimzahlen, die Keimzahlen in der Bauchlappenmuskulatur der leeren Fische aufgrund des Auswaschens der Fische mit Oberflächenwasser der Anlage bei log 5,13 KbE/g. Im Winter 1999 wurden in der Mehrzahl der Versuchsdurchgänge erst deutlich später (ab dem 13. Tag) und viel geringere *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen oberhalb der Quantifizierungsgrenze ermittelt. Am 15. Tag erreichten die Keimzahlen auf der Haut im Schnitt log 3,66 KbE/cm<sup>2</sup>, im Rückenmuskel log 3,23 KbE/g. Zwischen leeren und runden Fischen traten keine signifikanten Unterschiede in der Keimbelastung auf.

Aufgrund der bereits diskutierten Unzuverlässigkeit des VRBG-Nährbodens bei der Untersuchung von Fischgewebe auf *Enterobacteriaceae* und im Hinblick auf den erhöhten Arbeitsaufwand für die notwendige Oxidase-Prüfung der verdächtigen Kolonien (siehe 5.2.2) erscheint es sinnvoll, die Eignung der *Enterobacteriaceae* als Hygieneindikator bei Fischen zu überdenken, zumal sie zur natürlichen Darmflora bei Fischen gehören (SAKATA, 1989).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass von den untersuchten humanpathogenen Keimen bei rund belassenen Fischen kein erhöhtes Verbraucherrisiko ausging. Bei den insgesamt nur wenigen positiven Proben wurde bei runden Fischen keine Höherbelastung gefunden. Eine generelle Aussage, dass von runden Fischen keine Gefahr hinsichtlich humanpathogener Keime ausgeht,

kann aufgrund der niedrigen positiven Zahlen nicht getroffen werden, ein Risiko ist aber nicht auszuschließen.

#### **5.3.4 Diskussion des Zusammenhangs zwischen den mikrobiologischen Befunden und den Ergebnissen der Frischegradbestimmung**

Erst bei weit fortgeschrittenem Verderb des Fischgewebes mit Keimzahlen von  $10^7$  KbE/g oder höher werden Fehlgerüche und -geschmäcker durch die Produktion von chemischen Komponenten und Metaboliten des Mikroorganismenwachstums erfasst, so dass sie nicht der Vorhersage über die verbleibende Haltbarkeit des Fisches dienen können (JAY, 1986). Andere Autoren jedoch gehen davon aus, dass der Gehalt an spezifischen Verderbniserregern wie *Shewanella putrefaciens* und Pseudomonaden gut mit der verbleibenden Restlagerungsfähigkeit und somit mit der Frische des Fisches korreliert (JØRGENSEN et al., 1988; ÓLAFSDÓTTIR et al., 1997). In der vorliegenden Untersuchung wurden runde Regenbogenforellen durch die Frischegradbestimmung noch vor dem Erreichen von kritischen Keimzahlen auf der Haut und in der Muskulatur abgelehnt. Grund dafür waren die Zersetzungsprozesse der Eingeweide und der Bauchlappenmuskulatur. Diese sind weniger auf bakteriologische Vorgänge, sondern in erster Linie auf autolytische Prozesse zurückzuführen, da sich die Bauchhöhle als nahezu steril erwies. Diese Prozesse wirkten sich aber nicht nachteilig auf die Filetbeschaffenheit aus. Geringe Keimzahlen in der Rückenmuskulatur zeigen, dass sensorische Veränderungen und Verschlechterungen der Muskulatur nur geringfügig mit der Bakterienentwicklung in Verbindung gebracht werden können. Auf der Haut der Winterforellen jedoch war der Verlauf von Frischegradverschlechterung und Gesamt- bzw. Pseudomonaden-Keimzahl gut vergleichbar, zwischen Frischegrad und Keimzahlen zeigte sich eine geringe negative Korrelation ( $r = -0,79$ ). KOUTSOUMANIS und NYCHAS (1999) stellten eine hohe negative Korrelation ( $r = -0,96$ ) zwischen dem Gehalt an *Pseudomonas* spp. und *Shewanella putrefaciens* im Fischmuskelanteil und der verbleibenden Frische und Lagerfähigkeit von Gelbstriemen (*Boops boops*) aus dem Mittelmeer fest. Hier wurde am Tag der sensorischen Ablehnung der Fische nach einer Lagerung bei 0, 3, 7 und 10 °C in allen Untersuchungsgruppen eine Gesamtkeimzahl von  $\log 9$  KbE/g erreicht, bei höheren Temperaturen um einige Tage früher als bei niedrigeren.

Bei den Zandern der vorliegenden Untersuchung wurden auf der Haut die kritischen Keimzahlen von  $> \log 6$  bis  $\log 7$  KbE/cm<sup>2</sup> schon vor der sensorischen Ablehnung des Fisches erreicht, in der Rückmuskulatur jedoch waren während der gesamten Lagerzeit keine bzw. nur geringe Keimzahlen nachweisbar.

Inwieweit mikrobiologische Methoden und Angaben über den Gehalt an Gesamtkeimzahlen bzw. an spezifischen Verderbsorganismen (SSO) in Fischgewebe verwendbar sind, um die verbleibende Lagerfähigkeit von Frischfisch vorhersagen zu können, war zentraler Forschungsgegenstand einer europäischen Arbeitsgruppe (Konzertierte Aktion - CA concerted Action- „Evaluation of fish Freshness“) in einem dreijährigen Forschungszeitraum im Rahmen des 4. Europäischen Forschungsrahmenprogrammes (FAIR). Die Korrelation zwischen dem dekadischen Logarithmus der Zahl der SSO und der restlichen Lagerfähigkeit erwies sich bei einigen Erzeugnissen für die Frischebewertung als nützlich (ÓLAFSDÓTTIR et al., 1997; OEHLENSCHLÄGER, 1999). Auch HUIS IN'T VELD (1996) geht davon aus, dass am Anfang der Lagerung von Fisch spezifische Verderbniserreger im Fischgewebe nur einen sehr kleinen Teil der natürlichen Flora ausmachen, während der Lagerung jedoch in der Regel schneller wachsen als die übrige Mikroflora und die für Fehlgerüche und Schleimveränderung verantwortlichen Metaboliten produzieren, die schließlich zur sensorischen Ablehnung des Produktes führen. Die Keimzahl von SSO zum Zeitpunkt der sensorischen Ablehnung des Fisches könnte als minimaler Verderbslevel bezeichnet werden und die Konzentration an mit dem Verderb einhergehenden Metaboliten als objektiver chemischer Verderbsindex (DALGAARD, 1995). Somit wäre man in der Lage, durch die enge Relation zwischen der Restlagerfähigkeit und den log-Zahlen der SSO, mathematische Gleichungen zur Vorhersage der Restlaufzeit zu entwickeln.

### **5.3.5 Diskussion der Nematodenproblematik**

Bislang sind für den Ostseezander nur wenige Untersuchungen auf Nematodenbefall bekannt. FEILER u. WINKLER (1981) berichteten über sporadische Nematodenfunde nur bei sehr großen Zandern über 60 cm Körperlänge, in deren Mägen mit Nematodenlarven befallene adulte Heringe, die Hauptnahrung des Zanders im mesohalinen Bereich, gefunden wurden. Diese Zander wurden im Greifswalder Bodden, dem Achterwasser (Lassan) und dem östlichen und westlichen Teil der

Darßer Boddenkette gefangen. Im Frühjahr treten in den Gewässern um Rügen große Schwärme des laichreifen Rügenschens Frühjahrsherings auf, die stark mit *Anisakis*-Larven befallen sind (KRÜGER et al., 1976 zitiert von FEILER und WINKLER, 1981). Auch MÜNKER und KARL (2000) fanden bei Heringen, die im selben Fanggebiet gefangen wurden wie die in dieser Studie untersuchten Zander, einen starken Befall mit Nematodenlarven.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle für die unterschiedlichen qualitativen Untersuchung zur Verfügung stehenden Zander (insgesamt 171 Fische) auf das Vorkommen von Nematodenlarven untersucht. Kleinere Vorversuchsfische vom November und Dezember 2000 wiesen nur wenige Nematoden auf, während die ungewöhnlich großen Fische der Gruppe 4 (Fang April 2001) hochgradig belastet waren. Die Befallsrate der Eingeweide lag bei 19 bis 100 %, die der Muskulatur bei 5 bis 95 %. Die Befallsintensität und -häufigkeit hing von der Größe der Fische und dem Fangmonat ab. Eine Untersuchung zu einer möglichen Nematodenmigration wie bei den Seefischen hätte eine große Anzahl an Versuchsfischen erforderlich gemacht, eine solche Fanggröße war aber nicht zu realisieren.

Der äußeren Erscheinung nach handelte es sich bis auf eine Ausnahme um *Anisakis* spp. Die Nematoden fanden sich zum Teil in der Muskelschicht des Magens, verkapselt oder durch die äußere Serosa durchgebohrt oder dieser aufgelagert. Einige Larven waren in die seitliche Bauchwand eingebohrt, vereinzelt wurden Larven aber auch im Rückenmuskel nachgewiesen, wo sie beim Rohverzehr, z.B. in Form von Sushi, eine potentielle Gefahr für den Verbraucher darstellen.

Bei Ostseezandern muss demnach mit einem jahreszeitlich schwankenden, aber bereits bei Fischen mit weniger als 50 cm Körpergröße auftretenden Befall mit *Anisakis*-Larven gerechnet werden. Jedoch ist nach der jetzigen Fisch-Hygiene-Verordnung Süßwasserfisch bislang von den vorgeschriebenen Behandlungsverfahren zur Nematodenabtötung generell ausgenommen (Kapitel 5.6 der Anlage 1 der FischHV), da ihr Vorkommen hier nicht möglich schien. Daher sind weitere umfangreiche Untersuchungen über die Befallsrate mit Nematodenlarven bei den verschiedenen Brackwasserfischarten der Ostsee (Zander, Hecht, Barsch) notwendig, um das Risiko für den Verbraucher und mögliche Gegenmaßnahmen klären zu können.

### **5.3.6 Diskussion des Gehaltes an TVB-N in der Zandermuskulatur**

In der Zandermuskulatur kam es über den gesamten Lagerungszeitraum weder zu einer signifikanten Zunahme der TVB-N-Gehalte noch zu Unterschieden zwischen ausgenommen und rund gelagerten Fischen, da auch die Keimzahlen der SSO, die für die Bildung von TVB-N mitverantwortlich sind, in der Muskulatur beider Fischgruppen gleichermaßen niedrig waren. Die TVB-N-Werte blieben nahezu konstant bei etwa 10 - 12 mg/100 g Muskelfleisch. Auch die am 14. Lagertag einhellig in einer Frischegradbewertung als verdorben angesehenen Fische erreichten keine höheren Werte und blieben weit unter dem für Seefisch der nördlichen Breitengrade geltenden Grenzwert von 30 – 35 mg/100 g Muskelfleisch, der auch die Grenze der Genusstauglichkeit darstellt (HUSS, 1988, ABABOUCHE et al., 1996). Dies kann daran liegen, dass sich der TVB-N-Wert bei Kühlagerung von Fischen in schmelzendem Eis erst nach etwa 10tägiger Lagerung ändert (DEUFEL, 1963; ANTONOCOPOULOS, 1971). Da die Bestimmung dieses chemischen Parameters in der vorliegenden Untersuchung aufgrund der geringen Stichprobenzahl nur einen kleinen Einblick in die Entwicklung von TVB-N in der Muskulatur von Zandern während der Eislagerung gibt, kann nicht generell auf die Gesamtheit von Zandern geschlossen werden.

## **5.4 Gesamtbetrachtung der Diskussion**

Die Beurteilung von Frischeklassen, sensorische Untersuchungen durch die Verkostung von gekochten Fischfilets und die Messung von mikrobiologischen Parametern wurden in der vorliegenden Untersuchung verwendet und erwiesen sich als geeignet zur vergleichenden Beurteilung der Qualität von ausgenommenen und nicht ausgenommenen Forellen und Zandern. Unterschiede zwischen runden und ausgenommenen Fischen wurden in erster Linie mit Hilfe der Frischegradbewertung erkannt. Grund für die Schlechterbewertung der vollen Fische waren dabei weniger die äußerlichen Merkmale, sondern die vom Nüchterungsgrad abhängigen autolytisch bedingten Auflösungen der Eingeweide und der umschließenden Muskulatur. Ursache hierfür waren diffundierte Verdauungsenzyme der Gallenblase

und des Darmes. Die Verkehrsfähigkeit runder Fische wurde im Schnitt um 1 bis 3 Tage verkürzt, bei gefütterten Forellen um ca. 7 Tage.

Unterschiede beim bakteriellen Vergleich ergaben sich lediglich bei der Untersuchung der Bauchhöhlenbeschaffenheit von ausgenommenen und unausgenommenen Forellen nach "guter" und "schlechter" hygienischer Ausnahmepraxis. Rund belassene Fische schnitten in jedem Fall signifikant besser ab als ausgenommene. Besonders deutlich war dieser Unterschied beim Ausnehmen und Ausspülen der Fische unter ungünstigen hygienischen Bedingungen. Wenn keine optimalen Bedingungen gewährleistet werden können, ist ein späteres Ausnehmen vorteilhafter, da es andernfalls auf den ebenfalls verzehrbaren Bauchlappen zu einer schnelleren Vermehrung von Bakterien kommt. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist der Übertritt von Darmkeimen bei runden Fischen in die umgebende Bauchhöhle sehr viel geringer als die Belastung, die beim Ausnehmen verursacht wird. Eine erhöhte Belastung der Filetmuskulatur runder Fische ließ sich nicht feststellen.

Die bei der Beurteilung von Ganzfischen ermittelten Unterschiede in den Frischeklassen und der mikrobiologischen Untersuchung wirkten sich jedoch nicht auf das produzierte Lebensmittel (Filet) aus. Eine Verkostung ließ lediglich bei Forellen, die 24 Stunden vor der Schlachtung noch Nahrung erhielten, eine schlechtere Bewertung von Geruch und Geschmack im Vergleich zu genüchternen Forellen erkennen. So hatte eine mehrtägige Nüchterung vor der Schlachtung einen positiven Einfluss auf die Haltbarkeit und Qualität runder Fische. Zwischen runden und leeren Fischen gab es keine unterschiedlichen Bewertungen bei der Kochprobe. Eine gesundheitliche Gefährdung des Verbrauchers durch unausgenommen eisgelagerten Fisch scheint nicht gegeben zu sein. Eine generelle Empfehlung über den Zeitpunkt des Ausnehmens ist nicht möglich, da bei jeder Fischart durch die Größe des Tieres, den Bau des Verdauungstraktes und die Art des aufgenommenen Futters zahlreiche Einflussfaktoren eine Rolle spielen.

## 6 Zusammenfassung

Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit war der Einfluss des Ausnehmens auf die hygienische und sensorische Qualität von Süßwasserfischen. Im Rahmen eines Forschungsvorhabens des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) wurden Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) aus einer Forellenanlage und Zander (*Sander lucioperca*) aus Ostsee- und Boddengewässern ausgenommen und unausgenommen (leer und rund) in Eis bis zum Verderb gelagert und hinsichtlich ihres Keimgehaltes auf der Haut, im Darm, der Rücken- und in der Bauchlappenmuskulatur sowie ihrer sensorischen Eigenschaften alle 2 bis 3 Tage vergleichend untersucht. Die Frischegradbestimmung diente zur Ermittlung der Verkehrsfähigkeitsgrenze des Ganzfisches, die Verkostung der gekochten Rückenfiletproben zur Bestimmung der Verzehrsmöglichkeit. Dazu wurden, in Anlehnung an das EU-Qualitätsklassifizierungsschema der EG-Verordnung Nr. 2406/96 über gemeinsame Vermarktungsnormen, für beide Fischarten Frischegrad- und Kochprobenschemata entwickelt. Darüber hinaus wurde bei einer Zandergruppe der TVB-N-Gehalt der Filetanteile bestimmt sowie bei allen der insgesamt 195 untersuchten Zander auch die Befallsrate der Eingeweide und der Muskulatur mit Nematoden ermittelt. Die Untersuchungen fanden im Zeitraum von September 1999 bis September 2001 statt.

Im überwiegenden Teil der Ergebnisse zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen ausgenommenen und unausgenommenen Fischen. Lediglich in der Frischegradbeurteilung schnitten rund gelagerte Fische schlechter ab. Sie wurden durch autolytische Auflösungsprozesse im Bauchraum qualitativ so beeinträchtigt, dass sich ihre Verkehrsfähigkeit im Vergleich zu leeren Fischen verkürzte. Bei den Regenbogenforellen war die Auflösung der Eingeweide stärker ausgeprägt als bei den Zandern, so dass die rund belassenen Fische nach etwa 7 Tagen signifikant schlechter bewertet wurden als leere, ihre Lagerfähigkeit verkürzte sich um 1 bis 2 Tage. Besonders deutlich war dieser Unterschied bei rund gelagerten Forellen, die kurz vor der Schlachtung noch Futter erhalten hatten und deren Därme gefüllt waren. Diese Fische wurden zum Teil bereits nach 2 bis 3 Tagen aufgrund ihrer ekelerregenden Eigenschaften des Bauchraumes durch die Frischegradbestimmung

abgelehnt. Beim Zander wurde in der Frischegradbeurteilung die mittlere Qualität schnell erreicht und dann fast bis zum Ende der Lagerung beibehalten. Zwischen den Lagerungstagen 3 bis 10 kam es nur zu geringfügigen Veränderungen. Runde Fische wurden nach 8 Tagen mehrheitlich als nicht mehr verkehrsfähig eingestuft, leere nach 10 Tagen.

Bei der sensorischen Untersuchung der Filetanteile durch die Verkostung wurde hingegen weder bei den Regenbogenforellen noch bei den Zandern ein signifikanter Unterschied zwischen leeren und runden Fischen über den gesamten Lagerungszeitraum von ca. 10 Tagen festgestellt. Die Fische galten nach der Frischegradbestimmung bereits als verdorben, während die bakterielle Besiedlung der Haut und der Muskulatur noch unterhalb des sensorisch kritischen Grenzkeimgehaltes von  $10^6$  bis  $10^7$  KbE/g lag. Aus mikrobiologischer Sicht ist ein frühzeitiges Ausnehmen nicht erforderlich, da der verzehrsfähige Anteil runder Fische, die Filetmuskulatur, keine erhöhte Belastung zeigte im Vergleich zu leeren Fischen. Auch kam es bei den runden Fischen nicht zu einem massiven Übertritt von Darmkeimen in die Bauchhöhle. Diese blieb auch bei stark fortgeschrittenen Auflösungserscheinungen der Eingeweide nahezu steril. Hingegen wurde auf dem Peritoneum ausgenommener Fische stets eine signifikant höhere Keimzahl als bei runden Fischen ermittelt. Beim Ausnehmen war die Schlachthygiene und insbesondere die hygienische Beschaffenheit des zum Spülen der Fische verwendeten Wassers entscheidend für die Kontamination des Bauchfells, so dass man von einem erheblichen Einfluss der Schlachthygiene sprechen kann.

Ein Einfluss des Ausnehmens auf das Vorkommen von fakultativ humanpathogenen Keimen konnte nicht gezeigt werden. *Enterobacteriaceae* wurden nur in geringen Mengen auf der Haut und im Darm der untersuchten Fischarten nachgewiesen. Die ISO/FDIS 5552 1997-Methode, die im Gegensatz zur § 35-Methode nach LMBG eine Bestätigung von *Enterobacteriaceae*-verdächtigen Keimen durch biochemische Tests wie Oxidasereaktion und Glucosefermentation vorschreibt, erwies sich aufgrund der starken Begleitflora auf VRBG-Agar im Vergleich zu der § 35-Methode als besser geeignet und als selektiver für den Nachweis von *Enterobacteriaceae* in Fischgewebe. Potentiell humanpathogene Keime wie Salmonellen, Clostridien sowie Vibrionen wurden nicht nachgewiesen. Der quantitative Nachweis von Aeromonaden auf dem *Aeromonas*-Selektivmedium war nicht eindeutig, da durch die starke



Begleitflora eine Identifizierung und Quantifizierung von *Aeromonas* spp. sehr erschwert wurde. Bei nahezu alle Forellen der Winteruntersuchungen (1999) wurde qualitativ *Listeria innocua* gefunden. Diese gelangten bei der Schlachtung in und auf die Fische, da auch in der Umgebung und auf den zur Schlachtung benutzten Werkzeugen *L. innocua* nachgewiesen werden konnte. Bei der weiteren Untersuchung im Sommer 2001 wurden diese Befunde nicht bestätigt, ebenso waren die Zander frei von Listerien.

Für den Menschen gefährliche Nematodenlarven von *Anisakis simplex* fanden sich in den bislang in dieser Hinsicht als risikolos geltenden Ostseezandern zum Teil verkapselt auf den Organen der Bauchhöhle. Einige Larven waren der seitlichen Bauchwand angelagert und teilweise eingebohrt. Auch im Rückenmuskel konnten Larven nachgewiesen werden, wo sie beim Rohverzehr, z.B. in Form von Sushi, eine potentielle Gefahr für den Verbraucher darstellen. In der Fisch-HV sind Süßwasserfische von einer Pflicht zur Untersuchung auf Nematodenlarven bislang ausgenommen. Im Hinblick auf in Brackwasserzonen lebende Süßwasserfische wie Zander erscheint jedoch eine Untersuchung auf Parasiten angebracht.

Der Nachweis von TVB-N in der Filetmuskulatur von Zandern erbrachte mit stabilen Werten weit unterhalb dem für Seefisch geltenden Grenzwert von 30 – 35 mg/100g keine signifikanten Unterschiede zwischen ausgenommen und unausgenommen gelagerten Fischen.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass runde Fische, sofern eine optimale Lagerung gewährleistet werden kann, hygienisch unbedenklich und für einen Zeitraum von einigen Tagen qualitativ gleichwertig mit ausgenommenen Fischen sind. Dabei hängt der Zeitraum von Fischart und Nüchterung vor der Schlachtung ab. Mikrobiologische Gründe sprechen eher gegen ein frühzeitiges Ausnehmen. Demnach kann durch ein spätes Ausnehmen der Fische zwar ein schnellerer Qualitätsverlust bei Ganzfischen auftreten, aber aus hygienischer Sicht ist keine erhöhte Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers zu erwarten. Darüber hinaus haben sich die Frischegradschemata für Regenbogenforellen und Zander in den Untersuchungen bewährt und als geeignet für den weiteren Gebrauch erwiesen.

## 7 Summary

### **Effect of evisceration on the sensory and hygienic condition of ice-stored pike-perch (*Sander lucioperca*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**

In order to compare the hygienic and sensory quality of whole gutted and ungutted fresh water fishes, freshness and spoilage were monitored by measuring sensory and microbiological indicators. Gutted and ungutted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pike-perch (*Sander lucioperca*) were stored in melting ice until spoilage. Examinations were carried out every 2<sup>nd</sup> or 3<sup>rd</sup> day, or at the beginning and end of each storage period. Moreover, the content of TVB-N in muscle and the number of nematodes in the intestines and muscle were determined in the 195 pike-perches examined. Investigations were conducted from September 1999 until September 2001. In agreement with the EU quality grading scheme for marine fish (Council Regulation (EC) No. 2406/96 of 26 November 1996 laying down common marketing standards for certain fishery products) new grading schemes and more detailed sensory assessment sheets for cooked samples were developed for the two fresh water fish species.

The results have shown that, in most cases, there were no significant differences between gutted and ungutted fishes. Differences were found in the freshness categories only. After 7 days of storage, freshness of the ungutted trouts was assessed to be significantly below that of the gutted ones due to autolytic processes in their guts. Their shelf life was reduced by 1 to 2 days. Particularly the group of rainbow trouts fed shortly before slaughter and whose guts were filled was rejected by sensory assessment after 2 to 3 days of storage as a result of the disgusting organoleptic properties of their belly cavity. The ungutted pike-perches were rejected after 8, the gutted ones after 10 days. Between days 3 and 8/10 of storage, their freshness factors did not vary considerably. The examination of the cooked flesh samples did not reveal any significant sensory differences between gutted and ungutted fish for the entire storage period of 10 days.

On the basis of the sensory assessment, gutted and ungutted fish was rejected while the total viable aerobic count on the fish surface and in muscle was still below the

sensorily critical count of  $10^6$  to  $10^7$  cfu/g (colony forming units). From the microbiological point of view, early gutting of the fish is not required because the marketable part of the ungutted fish, the filet, did not show higher counts than that of the gutted fish. Furthermore, there was no massive contamination of the peritoneum by enteric pathogens in ungutted fish even when the decomposition of the guts through autolytic processes was at an advanced stage. The peritoneum of ungutted fish seemed to remain germ-free. In contrast, microbiological testing revealed that gutted fish had a significantly higher colony count on the peritoneum. Results have shown that the hygienic conditions prevailing during gutting and the quality of the water used for rinsing the abdominal cavity have a decisive influence on the contamination of the peritoneum. Therefore the fish should not be gutted in cases, where good hygienic conditions during slaughter and gutting cannot be guaranteed.

There was no evidence that gutting of fish would have an influence on the incidence of organisms potentially pathogenic to humans. *Salmonella* spp., *Clostridia* spp. as well as *Vibrio* spp. were not detected in trouts and pike-perch. The quantitative method for the enumeration of *Aeromonas* spp. on a selective medium did not produce clear results due to the presence of high numbers of concomitant microorganism. In the examinations conducted in winter 1999 almost all trouts were found to be contaminated with *Listeria innocua*. These organisms may have been carried over during the slaughter process and subsequent handling, since they were found to be present in the environment and on the tools used. In summer 2001, these findings were not confirmed since all trouts as well as the pike-perches were free from *Listeria* spp. *Enterobacteriaceae* were found to be present on the skin and in the intestines in small quantities only. The ISO/FDIS 5552 1997 method used for the detection of *Enterobacteriaceae* in pike-perch proved to be more sensitive for their identification in fish tissue than the § 35 method (LMBG) used in trout. The ISO method requires that findings of organisms suspected of belonging to the group of *Enterobacteriaceae* be confirmed using biochemical tests such as the oxidase reaction and glucose fermentation.

Larvae of the human pathogenic nematode *Anisakis simplex* were found to be present in the abdominal cavity of pike-perch which, in this respect, has so far been considered as safe. Some nematodes were found to stuck inside the belly flaps,

some were found even in the filets thus presenting a potential risk for the consumer, especially if fish is consumed raw like Sushi. In the German Fish Hygiene Regulations fresh water fishes are excluded from the examination for nematodes. However, with regard to fresh water fishes living in brackish water like pike-perch, an examination for parasites appears to be meaningful.

Measurement of the total viable basic nitrogen (TVB-N) in the muscle of pike-perch did not reveal any significant differences between gutted and ungutted fish. The content of TVB-N remained stable during the whole storage period with levels far below the limit of 30-35 mg/100g for marine fish.

It can be concluded from the results that, provided that optimal storage conditions are guaranteed, storage of ungutted fishes is to be recommended and preferred. Moreover, microbiological results do not support early gutting. Although late gutting results in a faster quality loss of the whole fish there is no increased health hazard for the consumer from the hygienic point of view.

In addition, the quality grading scheme for freshness proved to be suitable for use in gutted, ungutted and cooked rainbow trout and pike-perch samples in our examinations and can be recommended for further use.

## 8 Literaturverzeichnis

- ABABOUCHE L.H., M.E. AFILAL, H. BENABDELJELIL, F.F. BUSTA (1991): Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine stored at ambient temperatures ( 25-28 °C) and in ice. *Int. J. of Food Science and Technol.*, 26, 297-306
- ABABOUCHE L.H., L. SOUIBRI, K. RHALIBY, O. OUADHI, M. BATTAL, F.F. BUSTA (1996): Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. *Food Microbiology*, 13, 123-132
- ABO-ELNAGA I.G. (1980): The bacterial flora of some fresh-water fishes. *Arch. f. Lebensmittelhyg.*, 31, 181-183
- ACUFF G., A.L. IZAT, G. FINNE (1984): Microbial Flora of pond-reared tilapia (*Tilapia aurera*) held on ice. *J. of Food Protection*, 47, 778-780
- ADAMS R., L. FARBER, P. LERKE (1964): Bacteriology of spoilage of fish muscle. Part II. Incidence of spoilers during spoilage. *Appl. Microbiology*, 12 (3), 277-279
- AKSNES A., B. BREKKEN (1988): Tissue degradation, amino acid liberation and bacterial decomposition of bulk stored capelin. *J. Food Agriculture*, 45, 53-60
- ALONSO A., A. MORENO-ANCILLO, A. DASCHNER, M.C. LÓPEZ-SERRANO (1999): Dietary assessment on five cases of allergic reactions due to gastroallergic anisakiasis. *Allergy*, 54, 517-520
- AMBROGGI F., P. SEBASTIO, P. PIRAZZOLI, G. BALDRATI (1996): Influence of slaughter method on rainbow trout kept in captivity. II-Rigor mortis and muscle tissue texture. *Industria Conserve*, 71, 157-161
- ANONYM (1999): *Vibrio parahaemolyticus* in Japan, *Weekly Epidemiological Record*, 74 , (43), 29 October 1999, 361-363, WHO Geneva
- ANTONACOPOULOS N. (1971): Comparison of sensory and objective methods for quality evaluation of fresh and frozen saltwater fish., In: Kreuzer R. (Ed.): *Fish inspection and quality control*. Fishing News Books, Ltd. London, 180-182
- ARIK F., F. FIEDLER, M V. LUKOWICZ, B. SPERNER, A. STOLLE (2001): Untersuchungen

- zur Haltbarkeit von be- und verarbeiteten Süßwasserfischen. Arch. f. Lebensmittelhyg., 52(2), 34-39
- ARTHUR J. R., L. MARGOLIS, D.J. WHITAKER U. T. E. McDONALD (1982): A quantitative study of economically important parasites of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) from British Columbian waters and effects of postmortem handling on their abundance in the musculature. Can. J. Fish Aquat. Sci., 39, 710-726
- ASHIE I.N.A., J.P. SMITH, B.K. SIMPSON (1996): Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36 (1&2), 87-121
- AUDLEY M.A., K.J. SHETTY, J.E. KINSELLA (1978): Isolation and properties of phospholipase A from pollock muscle. J. Food Science, 43, 1771-1774
- AZAM K., M. MACKIE, J. SMITH (1989): The effect of slaughter method on the quality of rainbow trout during storage on ice. Int. J. of Food Science and Technol., 24, 69-79
- BANNEKE S., E. BARTELT, G. SIPOS, H. KARL, C. MEYER, F. LAGRANGE, U. JARK, F. FELDHOUSEN (2002): Ausnehmen von Fischen. Forschungsvorhaben zum Vergleich gesundheitlich-hygienischer und technisch-handelsrelevanter Aspekte bei ausgenommenen und nicht ausgenommen gelagerten Fischen. BgVV-Heft 04/2002, Berlin
- BACH R., S. WENZEL, G. MÜLLER-PRASUHN, H. GLÄSKER (1971): Teichforellen als Träger von *Clostridium botulinum* und Ursache von Botulismus. 3. Mitteilung: Nachweis von *Clostridium botulinum* Typ E in einer Teichwirtschaft mit Bearbeitungsbetrieb sowie in frischen und geräucherten Forellen verschiedener Herkunft. Arch. f. Lebensmittelhyg., 22 (5), 107-112
- BAUMGART J. (1996): Enterobacteriaceen. In: J. Baumgart (Hrsg.): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Verlag Behr's, Hamburg, Loseblattsammlung, Grundwerk 1994, 2. Ergänzungslieferung 11/96, Kapitel III.2.2
- BAUMGART J. (1998): *Clostridium botulinum*. In: J. Baumgart (Hrsg.): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Verlag Behr's, Hamburg,

- Loseblattsammlung, Grundwerk 1994, 6. Ergänzungslieferung 11/98, Kapitel III.3.2.6
- BAUMGART J. (2001): Genus *Shewanella*. In: J. Baumgart (Hrsg.): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Verlag Behr's, Hamburg, Loseblattsammlung, Grundwerk 1994 12. Ergänzungslieferung 02/01, Kapitel IV.5.23
- BAYLISS P.(1996): Chemistry in the kitchen: Fish and fish products. Nutrition & Food Science, No. 1, 41-43
- BEN EMBAREK P.K. (1994): Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafood: a review. Int. J. of Food Microbiol., 23, 17-34
- BgVV (1997): Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonose-Infektionen. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin
- BgVV (1999): Listerien-Infektionen vermeiden. BgVV Pressedienst vom 17.3.1999
- BgVV (2000): Empfehlungen zum Nachweis und zur Bewertung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung. Stand Juli 2000
- BgVV (2000): Gemeinsame Presseerklärung des Robert-Koch-Institutes und des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin: Botulismus nach dem Verzehr von Räucherfisch, Pressedienst vom 10. August 2000
- BILINSKI E., R.E.E. JONAS, M.D. PETERS (1983): Factors controlling the deterioration of the Spiny Dogfish during iced storage. J. of Food Science, 48, 808-812
- BJERKENG B., G. JOHNSON (1995): Frozen storage quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as affected by oxygen, illumination, and fillet pigment. J. Food Science, 60 (2) 284-288
- BOND C.E. (1996): Biology of Fishes Second edition, Saunders College Publishing, Harcourt Brace College Publishers, Forth Worth , San Diego, New York, 418-440

- BOCKEMÜHL J., K. ROCH, B. WOHLERS, V. ALEKSIC, S. ALEKSIC, R. WOKATSCH (1986): Seasonal distribution of facultatively enteropathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*) in freshwater of the Elbe River at Hamburg. J. of Appl. Microbiol., 60, 435-442
- BOCKEMÜHL J. (1992): Vibrionaceae In: F. Burkhardt (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik. Verlag Thieme, Stuttgart, New York, 102-108
- BORDAS M.A., M.C. BALEBONA, J.M. RHODRIGES-MAROTO, J.J. BORREGO, M.A. MORINIGO (1998): Chemotaxis of pathogenic *Vibrio* strains towards mucus surfaces of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). Appl. Environm. Microbiol., 64 (4), 1573-1575
- BORDERIAS A.J., M. LAMUA, M. TEJADA (1983): Texture analysis of fish fillet and minced fish by both sensory and instrumental methods. J. Food Technol., 18, 85-95
- BØRRESEN T. (1995): "Chemical composition" in Quality and Quality Changes in Fresh Fish In: FAO Fisheries Technical Papers No. 348, Ed. H.H. Huss, Food and Agriculture Organization, Rome, Italy, 20-33
- BRAMSNAES, F. (1954): Die Behandlung von Frischfisch. Arbeitstagung der OEEC, Norwegen, Juni 1954
- BREMER P.J., I. MONK, C.M. OSBORNE (2001): Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. J. of Food Protection, 64 (9), 1369-1376
- BRENNER H.A., J. OLLEY, J.A. STATHAM, A.M.A. VAIL (1988): Nucleotide catabolism: Influence on the storage life of tropical species of fish from the North West shelf of Australia. J. Food Science, 53 (1), 6-11
- BRYAN F. (1980): Epidemiology of foodborne diseases transmitted by fish, shellfish and marine crustaceans in the United States, 1970-1980. J. of Food Protection, 43 (11), 859-876
- BRYAN P.J., R.J. STEFFAN, A. DEPAOLA, J.W. FOSTER, A.K. BEJ (1999): Adaptive response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*. Current Microbiology, 38, 168-175



- BUCHANAN R.L., W.G. DAMERT, R.C. WHITING, M. VAN SCHOTHORST (1997): Use of epidemiological and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. *J. of Food Protection*, 60 (8), 918-922
- BURT F.R., G.M. DREOSTI, N.R. JONES, C.K. SIMMOND, G.D. STROUD (1974): Technological investigations onto Cape hake- I. Chilling at sea for freezing ashore. *J. of Food Technol.*, 9, 223-233
- CAMPBELL A.C. UND J.A. BUSWELL (1983): The intestinal microflora of farmed dover sole (*Solea solea*) at different stages of fish development. *J. Appl. Bacteriol.*, 55, 215-233
- CANN D.C., L.Y. TAYLOR, G. HOBBS (1975): The incidence of *Clostridium botulinum* in farmed trout raised in Great Britain. *J. Appl. Bacteriology*, 39, 331-336
- CHAI, T., C. CHEN, A. ROSEN UND R.E. LEVIN (1968): Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria on fish. II. Relative incidence of *Pseudomonas putrefaciens* and fluorescent pseudomonads on haddock fillets. *Appl. Microbiol.*, 16, 1738-1741
- CHEN H.C., T. CHAI T. (1982): Microflora of drainage from ice in fishing vessel fish holds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1360-1365
- CHOW C., Y. OCHIAI, S. WATABE, K. HASHIMOTO (1987): Autoxidation of bluefin tuna myoglobin associated with freezing and thawing. *J. Food Science*, 52 (3), 589-591
- CHURCH N. (1998): MAP fish and crustaceae-sensor enhancement. *Food Science and Technol. Today*, 12 (2), 73-83
- COLBURN K.G., C. KAYSNER, C. ABEYTA, M.M. WEKELL (1990): *Listeria* species in a california coast estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (7), 2007-2011
- COLBY J.W., L.G. ENRIQUEZ-IBARRA, G.J. FLICK JR. (1993): The shelflife of fish and shellfish. In: G. Charalambous (Ed.): *Shelf Life Studies in Foods and Beverages*. Elsevier, Amsterdam, 85-145
- COLWELL R.R., J. KAPER, S.W. JOSEPH (1977): *Vibrio cholera*, *Vibrio*

- parahaemolyticus and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. Science, 198, 394-396
- CONNER D.E., V.N. SCOTT, D.T. BERNARD, D.A. KAUTTER (1989): Potential Clostridium botulinum hazards associated with extended shelf life refrigerated foods: a review. J. of Food Safety, 10, 131-153
- DALGAARD P. (1995): Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. Int. J. Food Microbiol., 26, 305-317
- DALSGAARD A. (1998): The occurrence of human pathogenic Vibrio spp. and Salmonella in aquaculture. Int. J. of Food Science and Technol., 33, 127-138
- DAWOOD A.A., R.N. ROY, C.S. WILLAMS (1986): Effect of delayed icing on the storage life of rainbow trout. J. of Food Technol., 21, 159-166
- DE PAOLA A., G.M. CAPERS, D. ALEXANDER (1994): Densities of Vibrio vulnificus in the intestines of fish from the US gulf coast. App. Environm. Microbiol., 60, (3), 984-988
- DEARDORFF T.L. UND M.L. KENT (1989): Prevalence of larval Anisakis simplex in pen-reared and wild-caught Salmon (Salmonidae) from Puget Sound, Washington. J. Wildlife Dis. 25 (3); 416 – 419
- DEUFEL J. (1963): Vergleichende Untersuchung zur Bestimmung des Frischegrades von Süßwasserfischen. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchungen, 123, 354-361
- DURAN A.P., B.A. WENTZ, J.M. LANIER, F.D. MCCLURE, A.H. SCHWAB, R.J. BARNARD, A. SCHWARTZENTRUBER, R.B. READ JR. (1983): Microbiological quality of breaded shrimp during processing. J. of Food Protection, 46(11), 974-977
- EKLUND M.W. (1982): Significance of Clostridium botulinum in fishery products preserved short of sterilization. Food Technol., 39, 107-112
- EKLUND M.W. (1992): Control in fishery products. In: K.L. Dodds und A.H.W. Hauschild (Hrsg.): Clostridium botulinum, Ecology and Control of Foods, Kapitel 8, 209-231
- EKLUND M.W., F.T. POYSKY, R.N. PARANJPYE, L.C. LASHBROOK, M.E. PETERSON, G.A.

- PELROY (1995): Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold smoking fishery products and processing plants. *J. of Food Protection*, 58, 502-508
- ERBAN N., S. JULIEN, N. ORANGE, B. AUPERIN, G. MOLLE (2000): Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between their pore-forming properties and their antibacterial activities. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1467, 271-280
- FAERGEMAND J., B. RONSHOLDT, N. ALSTED, T. BORRESEN (1995): Fillet texture of rainbow trout as affected by feeding strategy, slaughtering procedure and storage post mortem. *Water Science Technol.*, 31 (10), 225-231
- FARBER J.M. (1991): *Listeria monocytogenes* in fish products. *J. of Food Protection*, 45 (12), 922-924, 934
- FEILER K. UND H.M. WINKLER (1981): Erstfunde von Anisakis-Larven im Zander, *Stizostedion lucioperca*, aus Küstengewässern der Ostsee. *Angewandte Parasitologie*, 22, 124-130.
- FELDHUSEN F. (1999): Durch Meerestiere übertragene Erkrankungen. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 106 (8), 319-325
- FELDHUSEN F. (2000): The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*, 2, 1651-1660
- FIEDLER K. (1991): Cypriniformes. In: *Lehrbuch der speziellen Zoologie, Band II: Wirbeltiere, 2. Teil: Fische*; D. Starck (Herausgeber), Gustav Fischer Verlag Jena, 280-283
- FELDMEIER H. UND G. POGGENSEE (1991): Human Anisakiasis: Epidemiology, pathophysiology, and clinical management. *Hospimedica*, October 1991, 46-54
- FIZ (2001): *Daten und Fakten*, Ausgabe 2001, Fisch-Informations-Zentrum e.V., Hamburg
- FONG W. UND K.H. MANN (1980): Role of gut flora in the transfer of amino acids through a marine food chain. *Aquat. Sci.*, 37, 88-96

- FRASER O.P. UND S. SUMAR (1998a): Compositional changes and spoilage in fish- an introduction. *Nutrition & Food Science*, No.5, 275-279
- FRASER O.P. UND S. SUMAR (1998b): Compositional changes and spoilage in fish (part II)-microbiological induced deterioration. *Nutrition & Food Science*, No.6, 325-329
- GILDBERG A. UND J. RAA (1980): Tissue degradation and belly bursting in capelin. In: J. Connell (Ed.), *Advances in Fish science and technology*, Fishing News Books Ltd, England, 255-258
- GILL T. (1995): Autolytic Changes In: H.H. Huss (Ed.): *Quality and Quality Changes in Fresh Fish* (FAO Fisheries Technical Papers No. 348), Food and Agriculture Organization, Rome, Italy, 39-50
- GOBAT P.F. UND T. JEMMI (1993): Distribution of mesophilic *Aeromonas* species in raw and ready-to-eat fish and meat products in Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.*, 20, 117-120
- GOBAT P.F. UND T. JEMMI (1995): Comparison of seven media for the isolation of mesophilic *Aeromonas* species in fish and meat. *Int. J. Food Microbiol.*, 24 (3), 375-84
- GONZÁLEZ C.J.,T. LÓPEZ-DÍAZ, M.L. GARCÍA-LÓPEZ, M. PRIETO, A. OTERO (1999): Bacterial Microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*) and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. of Food Protection*, 62 (11), 1270-1277
- GORCZYCA E., J.L. SUMNER, D. COHEN, P. BRADY (1985): Mesophilic fish spoilage. *Food Technology in Australia*, 37 (1), 24-26
- GRAM L. (1992): Evaluation of the bacteriological quality of seafood. *Int. J. of Food Microbiol.*, 16, 25-39
- GRAM L. (1993): Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *Appl. and Environment. Microbiol.*, 59 (7), 2197-2203
- GRAM L., G. TROLLE, H.H. HUSS (1987): Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *Int. J. of Food*

- Microbiol., 4, 65-72
- GRAM L., C. WEDELL-NEERGAARD, H.H. HUSS (1990): The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch. Int. J. of Food Microbiol., 10, 303-315
- GRAM L. UND H.H. HUSS (1996): Microbiological spoilage of fish and fish products. Int. J. of Food Microbiol., 33, 121-137
- GRAM L. UND J. MELCHIORSEN (1996): Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. J. of Appl. Bacteriology, 80, 589-595
- GRAM L., L. RAVN, M. RASCH, J.B. BRUHN, A.B. CHRISTENSEN, M. GIVSKOV (2002): Food spoilage- interactions between food spoilage bacteria. Int. J. Food Microbiol., 78, 79-97
- GUTTMAN-BASS N., N.M. NOE, B. FATTAL (1986): Microbiological content and health effect of fishponds enriched with wastewater effluent. Water Science and Technol., 18, 211-213
- GUYER S. UND T. JEMMI (1990): Betriebsuntersuchungen zum Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in geräuchertem Lachs. Arch. f. Lebensmittelhyg., 41 (6), 144-146
- HANSEN P. (1963): Fat oxidation and storage life of iced trout. J. of Science and Food Agriculture, 14, 781-786
- HASSAN M.M., K.M. RAHMAN, A. NAHAR (1994): Studies on the bacterial flora of fish which are potential pathogens for humans. Isolation of various potential human pathogenic organisms from different parts of fish and their significance in initiating human diseases. Bangladesh Medical Research Council Bulletin, 20 (2), 43-51
- HATHEWAY C.L. (1995): Botulism: The present status of the disease. Curr. Top. Microbiol., 195, 55-75
- HAUCK A.K. (1977): Occurrence and survival of the larval nematode *Anisakis* sp. in the flesh of fresh, frozen, brined, and smoked pacific herring, *Clupea harengus* Pallasi. J. Parasitology, 63 (39), 515-519

- HEINITZ M.L. UND J.M. JOHNSON (1998): The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. *J. of Food Protection*, 61 (3), 318-323
- HERALD P.J. UND E.A. ZOOTOLO (1988): Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *J. of Food Science*, 53, 1549-1562
- HERBORG L. UND A. VILLADSEN (1975): Bacterial infection / invasion in fish flesh. *J. of Food Technol.*, 10, 507-513
- HERRERAS M.V., F.J. AZNAR, J.A. BALBUENA, J.A. RAGA (2000): Anisakis larvae in the musculature of the Argentinian hake, *Merluccius hubbsi*. *J. of Food Protection*, 63 (8); 1141 – 1143
- HJELMLAND K., M. CHRISTIE, J. RAA (1983): Skin mucus protease from rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Biological significance. *J. Fish Biology*, 23, 13-22
- HLADY W.G. (1997): *Vibrio* infections associated with raw oyster consumption in Florida, 1981-1994. *J. of Food Protection*, 60, 353-357
- HOBBS G. (1991): Submitted paper- Fish: microbiological spoilage and safety. *Food Science and Technol. Today*, 5 (3), 166-173
- HOBBS G. UND W. HODGKISS (1982): The bacteriology of fish handling and processing. In: R.Davies (Ed.): *Developments in Food Microbiology*, Appl. Science Publishers, 71-117
- HØI L., J.L. LARSEN, I. DALSGAARD, A. DALSGAARD (1998): Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in danish marine environments. *Appl. and Environm. Microbiology*, 64 (1), 7-13
- HONDA T. UND T. IIDA (1993): The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Reviews in Medical Microbiology*, 4, 106-113
- HORSLEY R.W. (1973): The bacterial flora of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in relation to its environment. *Journal Appl. Bacteriology*, 36, 377-386

- HOWGATE P. (1998): Review of the public health safety of products from aquaculture. Int. J. Food Science and Technol., 33, 99-125
- HOYER J. (1996): Klinischer Verlauf und mikrobiologische Diagnostik der ersten bekannt gewordenen Infektion mit *Vibrio vulnificus* in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt, 6, 211-212
- HUIS IN'T VELD J.H.J. (1996): Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. Int. J. Food Microbiol., 33, 1-18
- HUSS H.H. (1988): Fresh fish-quality and quality changes. FAO Fisheries series No. 29, Rome
- HUSS H.H. (Ed.) (1995): Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries technical Paper, No. 348, Rome, FAO
- HUSS H.H. (1997): Controll of indigenous pathogenic bacteria in seafood, In: Martin R., et al. (Eds.), Fish Inspection, Quality Control and HACCP- A Gobar Focus, (Proceedings), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pennsylvania, USA
- HUSS H.H., A. PEDERSEN, D.C. CANN (1974): The incidence of *Clostridium botulinum* in Danish trout farms. I. Distribution in fish and in their environment. J. of Food Technol., 9, 445
- HUSS, H.H. UND S. DREWES (1989): Occurrence of nematodes (*Anisakis* sp. larvae) in North Sea herring (*Clupea harengus*). Effect of commercial fish handling. Tenth Int. Symp. World Assoc. Vet. Food Hygienists, Stockholm
- HUSS H.H., L.V. JØRGENSEN, B. FONNESBECH VOGEL (2000): Control options für *Listeria monocytogenes* in seafood. Int. J. of Food Microbiology, 62, 267-274
- HUSSAIN A.M. (1976): Wirkung der Rarisation auf die Mikroflora von vakuumverpackten Forellen (*Salmo gairdneri*). Arch. f. Lebensmittelhyg., 27, 223-225
- HYTYIÄ E., S. HIELM, H. KORKEALA (1998): Prevalence of *Clostridium botulinum* type E in finnish fish and fishery products. Epidemiol. Infect., 120, 245-250
- HYTYIÄ-TREES E., M. LINDSTRÖM, B. SCHALCH, A. STOLLE, H. KORKEALA (1999): *Clostridium botulinum* type E in bavarian fish. Arch. für Lebensmittelhyg., 50

(4/5), 79-83

ICMSF: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (1998): Microorganism in Foods. 6. Microbial Ecology of Food Commodities, Volume 2, publ. by Academic Press, Blackie Academic & Professional, London, UK

ICMSF: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (1986): Sampling plans for fish and shellfish. In: ICMSF, Microorganisms in Foods, 1. Their significance and methods of enumeration, 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, Canada

JAMES D.G. (1986): The prospects of fish for the undernourished food and nutrition. FAO, 12, 22-27

JAY J.M. (1986): Microbial spoilage indicators and metabolites. In: M.D. Pierson und N.J. Stern (Eds.), Food-borne Microorganisms and their toxins: Developing Methodology, Marcel Dekker, New York and Basel, 219-240

JEMMI T. (1990): Zum Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in importierten geräucherten und fermentierten Fischen. Arch. f. Lebensmittelhyg., 41, 107-109

JEMMI T. UND A. KEUSCH (1992): Behavior of *Listeria monocytogenes* during procession and storage of experimentally contaminated hot-smoked trout. Int. J. of Food Microbiol., 15, 339-346

JEMMI T. UND A. KEUSCH (1993): Occurence of *Listeria monocytogenes* in freshwater fish farms and fish-smoking plants. Food Microbiology, 11, 309-316

JØRGENSEN B.R., D.M. GIBSON, H.H. HUSS (1988): Microbiological quality and shelf life prediction of chilled fish. Int. J. Food Microbiol., 6, 295-307

JOSEPHSON D.B., R.C. LINDSAY, D.A. STUIBER (1987): Enzymic hydroperoxide initiated effects in fresh fish. J. of Food Science, 52(3), 596-600

KANNER J. UND J.E. KINSELLA (1983): Initiation of lipid peroxidation by a peroxidase/hydrogen peroxide/halide system. Lipids, 18, 204

KARL H. UND M. LEINEMANN (1995): Fisch als Lebensmittel, Nematodenlarven in



- Heringen aus verschiedenen Fanggebieten. Inf. Fischwirtsch., Fischereiforsch., 42 (2); 89 – 94
- KARL H., C. MEYER, W. MÜNKNER (2001): Vergleichende Eislagerung von ausgenommenen und unausgenommenen Schleien. Inf. Fischwirtsch. Fischereiforsch., 48 (3), 139.143
- KARNOP G. (1978): Die Bakteriologie des Verderbens von Frischfisch - ihre Probleme und deren Lösungsmöglichkeiten. Deutsche Lebensmittel Rundschau, 74 (5), 200-205
- KARNOP G. (1982): Die Rolle der Proteolyten beim Fischverderb II. Vorkommen und Bedeutung der Proteolyten als bakterielle Verderbnisindikatoren. Arch. f. Lebensmittelhyg., 33 (3), 61-66
- KAYSER F.H. (1993): Erreger bakterieller Infektionen. In: F.H. Kayser, K.A. Bienz, J. Eckert, J. Lindenmann (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 8. Auflage, Kap.4, 152-274
- KHALIL L.F. (1969): Larval nematodes in the herring (*Clupea harengus*) from British coastal waters and adjacent territories. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 49, 641-659
- KIM B.C. (1984): Der Schlachtkörperwert und die Fleischqualität bei Regenbogenforellen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Landwirtschaftlichen Fakultät Göttingen
- KORKEALA H., G. STENGEL, E. HYYTIÄ, B. VOGELSANG, A. BOHL, H. WIHLMAN, P. PAKKALA, S. HIELM (1998): Type E botulism associated with vacuum-packaged hot-smoked whitefish. Int J. Food Microbiol., 43, 1-5
- KOUTSOUMANIS UND NYCHAS (1999): Chemical and sensory changes associated with microbial flora of mediterranean Boque (Boops boops) stored aerobically at 0, 3, 7, and 10°C. Appl. and Environm. Microbiol., 65 (2), 698-706
- KRÄMER J. (1997): Lebensmittelmikrobiologie, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, Taschenbuch 1421, 3. Aufl.
- KRÜGER G.E., E. BIESTER, N. JÖNSSON (1976): Preliminary results of the herring marking action in the Greifswalder Bodden in 1976. ICES C.M. 1976/P: 16. Baltic Fish Committee, 7 ff..

- LAGLER K.F., BARDACH J.E., MILLER R.R., MAY PASSINO D.R. (1977): Ichthyology, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc. New York, London, Sydney
- LAGRANGE F. (2002): Einfluss des Ausnehmens auf die Qualität von Frischfisch. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades Dr. med. vet. durch die Tierärztliche Hochschule Hannover
- LARSEN J.L., N.C. JENSEN, N.O. CHRISTENSEN (1978): Water pollution and the ulcer-syndrom in the cod (*Gadus morhua*) Vet. Sci. Commun., 2, 201-216.
- LEE J.V., D.M. GIBSON, J.M. SHEWAN (1977): A numerical study of some *Pseudomonas*-like marine bacteria. J. of General Microbiology, 98, 439-451
- LEN P.P. (1987): Mesophilic spoilage of marine fish: bay trout, bream and mullet. Food Technology in Australia, 39 (6), 277-282
- LEROI F., J.J. JOUFFRAUD, F. CHEVALIER, M. CARDINAL (2001): Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. J. of Appl. Microbiol., 90, 578-587
- LEUNG C.-K., Y.-W. HUANG, O.C. PANCORBO (1992): Bacterial pathogens and indicators in catfish and pond environment. J. of Food Protection, 55 (6), 424-427
- LEUPOLD G. (1997): Lebensmittelhygienische Untersuchungen an Regenbogenforellen nach Anwendung verschiedener Betäubungsverfahren. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr.med.vet. an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
- LINDBERG A.-M., A. LJUNGH, S. AHRNÉ, S. LÖFDAHL, G. MOLIN (1998): Enterobacteriaceae found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. Int. J. of Food Microbiol., 39, 11-17
- LISTON J. (1980): Microbiology in fishery science. In: Connel J.J. (Ed.), Advances in Fish Science and Technology, Fishing News Books, Ltd., Farnham, Surrey, England, 138-157
- LOWE T.E., J.M. RYDER, J.F. CARRAGHER, R.M.G. WELLS (1993): Flesh quality in

- snapper, *Pagrus auratus*, affected by capture stress. J. of Food Science, 58 (4), 770-773
- LUPIN H.M., D.H. GIANNINI, C.L. SOULÉ, L.A. DAVIDOVICH, R.L. BOERI (1980): Storage life of chilled Patagonian hake. J. of Food Technol., 15, 285-300
- LYHS U., J. BJÖRKROTH, E. HYYTIÄ, H. KORKEALA (1998): The spoilage of vakuum-packed, sodium nitrite or potassium nitrate treated, cold-smoked rainbow trout stored at 4°C or 8°C. Int. J. of Food Microbiol., 45, 135-142
- MAC DONELL M.T. UND R.R. COLWELL (1985): Phylogenie of the Vibrionaceae, and recommendation für two new genera, Listonella and Shewanella. Syst. Appl. Microbiol., 6, 171-182
- MACFARLANE R.D., J.J. McLAUGHLIN, G.L. BULLOCK (1986): Quantitative and qualitative studies of gut flora in striped bass from estuarine and coastal marine environments. J. of Wildlife Diseases, 22 (3), 344-348
- MAIA E.L., D.B. RODRIGUEZ-AMAYA, M.A.C. MORAES (1983): Sensory and chemical evaluation of the keeping quality of the brazilian freshwater fish *Prochilodus scrofa* in ice storage. J. of Food Science, 48, 1075-1077
- MANGOLD S. (1991): Vorkommen und Verhalten von Listerien in tiefgefrorenen Lebensmitteln. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr.med.vet an der FU-Berlin
- MANTHEY M. UND H. KARL (1984): Untersuchungen zur Qualität von tropischen Buntbarschen (*Sarotherodon nilotica*) bei Eislagerung. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 80 (6), 175-178
- MEYER C. UND J. OEHLenschLÄGER (1996): Sensorische Bewertung, Mikrobiologie und chemische Kenngrößen von eisgelagertem Wittling (*Merlangius merlanus*). Inf. Fischwirtschaft, 43 (2), 89-94
- MIETTINEN H., K. AARNISALO, S.M. SALO, A.M. SJÖBERG (2001): Evaluation of surface contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in fish processing factories. J. Food Protection, 64 (5), 635-639
- MÖLLER H. (1988): Das Nematodenproblem bei Fischen und Fischerzeugnissen. Rundschau für Fleischuntersuchung und Lebensmittelüberwachung, 40 (10),

195-198

- MÖLLER H. UND K. ANDERS (1983): Krankheiten und Parasiten der Meeresfische. Verlag H. Möller, Kiel, 121-148
- MÖLLER H. UND S. SCHRÖDER (1987): Neue Aspekte der Anisakiasis in Deutschland. Arch. für Lebensmittelhyg., 38, 121-148.
- MÜNKNER W. UND H. KARL (2000): Ostseehering (*Clupea harengus*) – eine Rohwarenressource für die deutsche Fischwirtschaft? Inf. Fischwirtsch. Fischereiforsch., 47(4); 193 – 204
- MURRAY C.K. UND T.C. FLECHTER (1976): The immunohistochemical location of lysosome in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. J. Fish Biology, 9, 329-334
- NASCETTI G., L. POGGI, P. ORACCHIA, J.W. SMITH, S. MATIUCCI, L. BULLINI (1986): Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and north-east Atlantic. Int. J. Parasitology, 16, 633-640
- NEDOLUHA P.C. UND D. WESHOFF (1993): Microbiological flora of aquacultured hybrid striped bass. J. of Food Protection, 56, 1054-1060
- NEDOLUHA P.C. UND D. WESHOFF (1995): Microbiological analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) grown in flow-through tanks. J. of Food Protection, 58, 1363-1368
- NEDOLUHA P.C. UND D. WESHOFF (1997): Microbiological analysis of striped bass grown in three aquaculture systems. Food Microbiol., 14, 255-264
- NICHIBUCHI M. UND J.B. KAPER (1995): Minireview: Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. Infection and Immunity, 63, 2093-2099
- NIEPER L. UND J. STOCKEMER (1986): Zur Eignung der Bestimmung des TVB-N-Gehaltes, des TMA-N-Gehaltes sowie von biogenen Aminen zur Beurteilung der Genusstauglichkeit von Rotbarsch. Arch. f. Lebensmittelhyg., 37 (5), 117-118
- OEHLENSCHLÄGER J. (1989): Die Gehalte an flüchtigen Aminen und Trimethylaminoxid

- in fangfrischen Rotbarschen aus verschiedenen Fanggebieten des Nordatlantik. Arch. f. Lebensmittelhyg., 40 (3), 55-58
- OEHLENSCHLÄGER J. (1999): Fisch als Lebensmittel- Beurteilung der Frische von Fischen: Ergebnisse und Empfehlungen einer Konzertierte Aktion im Rahmen von FAIR. Inf. Fischwirtsch. Fischereiforsch. 46 (1), 36-41
- OEHLENSCHLÄGER J. UND H. REHBEIN (2000): Shelf life of gutted and ungutted ocean perch (*Sebastes marinus* and *S. mentella*) during ice-storage. 30th WEFTA, Torshavn, Faroe Islands
- ÓLAFSDÓTTIR G., E. MARTINSDÓTTIR, J. OEHLENSCHLÄGER, P. DALGAARD, B. JENSEN, I. UNDELAND, I.M MACKIE, G. HENEHAN, J. NIELSEN, H. NILSEN (1997): Methods to evaluate fish freshness in research and industry. Trends in Food Science & Technol. Today, 8, 258-265
- OLIVER J. D. (1995): The viable but non-culturable state in human pathogen *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiology Letters, 133, 203-208
- OLSON, A.C., M.D. LEWIS, M.L. HAUSER (1983): Proper identification of anisakine worms. Am. J. Med. Technol., 49 (2); 111 – 114
- ONARHEIM A.M. UND J. RAA (1990): Characteristics and possible biological significance of an autochthonous flora in the intestinal mucosa of sea water fish. In: R. Lesel (ed.), Microbiology in poecilotherms. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 197-201
- OSTRANDER J. UND C. MARTINSEN (1976): Sensory testing of pen-reared salmon and trout. J. of Food Science, 41, 386-390
- OXOID (1993): OXOID-Handbuch, 5. aktualisierte deutsche Auflage, B.Gerten (Hrsg.), Unipath GmbH, Wesel, 200-203
- PEDROSA-MENABRITO A. UND J.M REGENSTEIN (1988): Shelf-life extension of fresh fish- A review. Part I- Spoilage of fish. J. of Food Quality, 11, 117-127
- PIN C., M.L. MARIN, M.L. GARCIA, J. TORMO, C. CASAS (1994): Comparison of different media for the isolation and enumeration of *Aeromonas* spp. in foods. Lett. in Appl. Microbiol., 18, 190-192

- PRIEBE K. (1984): Beitrag zur Eignung des Histamingehaltes als Maßstab der Verderbnis von Fischen. Arch. f. Lebensmittelhyg., 35 (6), 123-128
- REDDY N.R., H.M. SOLOMON, M.G. ROMAN, E.J. RHODEHAMEL (1997): Shelf life and toxin development by *Clostridium botulinum* during storage of modified-atmosphere-packaged fresh aquacultured salmon fillets. J. of Food Protection, 60 (9), 1055-1063
- REILLY A. (1998): Emerging food safety issues and the seafood sector. Food Safety Unit, Programme of Food Safety and Food Aid, World Health Organization, 20 Avenue Appia, Ch-1211 Geneva 27, Switzerland, Paper presented at the Symposium on Fish Utilization in the Asia-Pacific Region, in conjunction with the 26<sup>th</sup> Session on the Asia-Pacific Fisheries Commission, Beijing, People's Republic of China, 24-30 September 1998
- RHODES M.W. UND H. KATOR (1988): Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. Appl. Environ. Microbiol., 54 (12), 2902-2907
- RIMMER F.W. UND W.J. WIEBE (1987): Fermentative microbial digestion in herbivorous fishes. J. Fish Biology, 31, 229-236
- RINGØ E. H.R. BENDIKSEN, M.S. WESMAJERVI, R.E. OLSEN, P.A. JANSEN, H. MIKKELSEN (2000): Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J. of Appl. Microbiol., 89, 317-322
- RINGØ E., E. STENBERG, A.R. STRØM (1984): Amino acid and lactate catabolism in trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens* NCMB 1735. Appl. and Environm. Microbiol., 47 (5), 1084-1089
- RINGØ E., J.B. LØDEMEI, R. MYKLEBUST, T. KAINO, T.M. MAYHEW, R.E. OLSEN (2001): Epithelium-associated bacteria in the gastrointestinal tract of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). An electronmicroscopical study. J. of Appl. Microbiology, 90, 294-300
- ROBINETTE D., S. WADA, T. ARROLI, M.G. LEVY, W.L. MILLER, E.J. NOGA (1998): Antimicrobial activity in the skin of channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. Call. Mol. Life Science, 54 (5), 467-475

- RODRIGUEZ C.-J., I. BESTEIRO, C. PASCUAL (1999): Biochemical changes in freshwater rainbow trout during chilled storage. J. of the Science of Food and Agriculture, 79, 1473-1480
- ROEPSTORFF, A., H. KARL, B. BLOEMSMA, H.H. HUSS (1993): Catch handling and the possible migration of Anisakis larvae in herring, *Clupea harengus*. J. of Food Protection, 56 (9), 783-787
- RØRVIK L.M., D.A. CAUGANT, M. YNDESTAD (1995): Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. Int. J. of Food Microbiol., 25, 19-27
- RUSKOL D. UND P. BENDSEN (1992): Invasion of *S. putrefaciens* during spoilage of fish. M. Sc. Thesis, Technological Laboratory and the Technical University, Denmark zit. nach H.H. Huss (1995)
- RYDER J.M., G.C. FLETCHER, M.G. STEC, R.J. SEELYE (1993): Sensory, microbiological and chemical changes in hoki stored in ice. Int. J. of Food Science and Technol., 28, 169-180
- SAKATA T. (1989): Microflora of healthy animals, In: Methods for microbiological examination of fish and shellfish. Ed. B. Austin und D.A. Austin, Department of Biological Sciences, Heriot-Watt University, Edinburgh, Scotland; Ellis Horwood Limited, West Sussex, England, 141-163
- SAKATA T., J. OKABAYASHI, D. KAKIMOTO (1980): Variations in the intestinal microflora in Tilapia reared in fresh and seawater. Bull. Jap. Soc. Scient. Fisheries, 46, 313-317
- SAKAZAKI R. (1986): *Vibrio* species: their isolation and identification. Oxoid culture, 7 (1)
- SAUPE C. (1989): Mikrobiell bedingte Gefährdung des Menschen durch Fisch und Fischerzeugnisse und Möglichkeiten ihrer Verhinderung. Monatsheft Vet.-Med., 44, 54-59
- SAUPE C. (1996): Mikrobiologie der Fische- und Fischwaren. In: H. Weber (Hrsg.): Mikrobiologie der Lebensmittel - Fleisch- und Fleischerzeugnissen, 1. Auflage, Behr's Verlag Hamburg, 667-760

- SCHLÜTER S. (1997): Einfluss externer Faktoren auf den Flavor gedünsteter Karpfenfilets. Diss. zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg.
- SCHRECKENBACH K. (1990): Immunprophylaxe in der Fischproduktion. In: F. Horsch (Hrsg.): Immunprophylaxe bei Nutztieren. G. Fischer Verlag Jena, 2. überarb. Auflage, 621-627.
- SCHUBERT R. (1992): Aeromonas und Plesiomonas. In: F. Burkhardt (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik. Verlag Thieme, Stuttgart, New York, 109-111
- SCHULZE K. (1986): Botulismus nach dem Verzehr von selbst eingelegten Heringen. Toxin- und Keimnachweis. Arch. f. Lebensmittelhyg., 37, 125
- SCHUSTER R., K. WANJEK, E. SCHEIN (2001): Untersuchungen zum Vorkommen von Muskelmetazerkarien bei Plötzen (*Rutilus rutilus*) aus Berliner Gewässern. Ein Beitrag zur lebensmittelhygienischen Relevanz einheimischer Süßwasserfische. Arch. f. Lebensmittelhyg., 52 (4/5), 102-104
- SCOTT D.N., G.C. FLETCHER, M.G. HOGG, J.M. RYDER (1986): Comparison of whole with headed and gutted Orange Roughy stored in Ice: Sensory, microbiology and chemical assessment. J. of Food Science, 51 (1), 79-86
- SCOTT D.N., G.C. FLETCHER, J.C. CHARLES, R.J. WONG (1992): Spoilage changes in the deep water fish, smooth oreo dory during storage in ice. Int. J. of Food Science and Technol., 27, 577-587
- SEBASTIO P., F. AMBROGGI, G. BALDRATI (1996): Influence of slaughter method on rainbow trout bred in captivity. I. Biochemical considerations. Industria Conserve, 71, 37-49
- SEELIGER H.P.R. UND D. JONES (1986): Genus Listeria. In: P.H.A. Sneath (Ed.); Bergey's Manual of Systematic bacteriology, The Willams and Wilkens Co., Baltimore, Md., Vol 3, 1235
- SHEWAN J.M. (1971): Microbiology of fish and fishery products – A progress report. J. Appl. Bacteriology, 34 (2), 299-315
- SHEWAN J.M. UND C.K. MURRAY (1979): The microbial spoilage of fish with special reference to the role of psychrophiles. In: A.D. Russel und R. Fuller (Eds.): Cold



- Tolerante Microbes in spoilage and the Environment, The Society for Applied Bacteriology , Technical Series No. 13, Reading, UK, Academic Press, London, New York; 117-136
- SIESENOP U. UND K.H. BÖHM (2000): Siebzehn Jahre fischbakteriologische Diagnostik an der tierärztlichen Hochschule Hannover-Erfahrungen, Ergebnisse, praktische Hinweise für die Diagnostik, 2. Mitteilung. Tierärztl. Umschau, 55, 89-96
- SKOVGAARD N. (1979): Bacterial association and metabolic activity in fish in North Western Europe. Arch. f. Lebensmittelhyg., 30 (3), 106-109
- SMITH J.W. (1984): The abundance of Anisakis simplex L3 in the body-cavity and flesh of marine teleosts. Int. J. Parasit., 14, 491-495
- SMITH J.W. (1999): Ascaroid nematodes and pathology of the alimentary tract and its associated organs in vertebrates review. Helminthology Abstracts, 68, 49-96
- SMITH V.J., M.O. FERNANDES, S.J. JONES, G.D. KEMP, M.F. TATNER (2000): Antibacterial proteins in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish & Shellfish Immunology, 10, 243-260
- SON N.T. UND G.H. FLEET (1980): Behavior of pathogenic bacteria in the oyster, crassostrea commercialis, during depuration, re-laying and storage. Appl. Environm. Microbiol., 40 (4), 994-1002
- SPERBER W.H. (1982): Bedingungen, die für das Wachstum und die Toxinproduktion von Clostridium botulinum nötig sind. Food Technol., 36 (12), 89-94
- STEFFENS W. (1985): Vitamin K. In: Grundlagen der Fischernährung. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, Kapitel 5.5, 127-128
- STEINMEYER S. UND G. TERPLAN (1990): Listerien in Lebensmitteln- eine aktuelle Übersicht zu Vorkommen, Bedeutung als Krankheitserreger, Nachweis und Bewertung, Teil I. dmz Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft, 5, 150-155
- STENSTRÖM I.-M. UND G. MOLIN (1990): Classification of the spoilage flora of fish, with special reference to Shewanella putrefaciens. J. of Appl. Bacteriology, 68, 601-618

- STROM M.S. UND R.N. PARANJPYE (2000): Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection*, 2, 117-188
- STROMNES E. UND K. ANDERSEN (1998): Distribution of whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematoda, Ascaridoidea) L3 larvae in three species of marine fish, saithe (*Pollachius virens* L.), cod (*Gadus morhua* L.) and redfish (*Sebastes marinus* L.) from Norwegian waters. *Parasitol. Res.*, 84, 281 - 285
- SUGITA H., K. TANAKA, M. YOSHINAMI, Y. DEGUCHI (1995): Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. *Appl. Environm. Microbiol.*, 61, 4128-4130
- SUGITA H., J. KAWASAKI, Y. DEGUCHI (1997): Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 105-108
- TESKEREDZIC Z. UND K. PFEIFER (1997): Determining the degree of freshness of Rainbow Trout cultured in brackish water. *J. of Food Science*, 52, 1101-1102
- THAMPURAN N. UND P.K. SURENDRAN (1998): Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* in tropical fish and shellfish from Cochin (India). *Letters in Appl. Microbiol.*, 26, 110-112
- TORANZO A.E., J.M. CUTRIN, B.S. ROBERSON, S. NUNEZ, J.M. ABELL, F.M. HETRICK, A.M. BAYA (1994): Comparison of the taxonomy, serology, drug resistance transfer, and virulence of *Citrobacter freundii* strains from mammals and poikilothermic hosts. *Appl. Environm Microbiol.*, 60 (6), 1789-1797
- TOWNLEY R.R. UND T.C. LANIER (1981): Effect of early evisceration on the keeping quality of Atlantic croaker and Grey trout as determined by subjective and objective methodology. *J. of Food Science*, 46, 863-867
- TRUELSTRUP HANSEN L., T. GILL, H.H. HUSS (1995): Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Research International*, 28 (2), 123-130
- TRUST T.J. UND R.A.H. SPARROW (1974): The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. *Can. J. Microbiol.*, 20, 1219-1228
- TSAI G.J. UND T.H. CHEN (1996): Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood. *Int. J. of Food Microbiol.*, 31, 121-131

- TÜLSNER M. (1994): Fischverarbeitung- Band 1. Rohstoffeigenschaften und Grundlagen der Verarbeitungsprozesse, Behr's Verlag Hamburg
- VENOGUPAL V. (1990): Extra cellular proteases of contaminant bacteria in fish spoilage: a review. J. of Food Protection, 53, 341-350
- WARD D.R. (1989): Microbiology of Aquaculture Products. Food Technol., November 1989, 82-86
- WARD D.R. UND N.J. BAJ (1988): Factors affecting microbiological quality of seafoods. Food Technol., 42, 85-89
- WEAGANT S.D., P.N. SADO, K.G. COLBURN, J.D. TORKELSON, F.A. STANLEY, S.C. SHIELDS, C.F. THAYER (1988): The Incidence of Listeria species in frozen seafood products. J. of Food Protection, 51 (8), 655-657
- WEDEKIND H. (1995): Qualität bei Süßwasserfischen und ihre Beeinflussung durch tierbedingte Faktoren. In: M. v.Lukowicz (Hrsg.): Süßwasserfisch als Lebensmittel, *Heft 62* des Deutschen Fischereiverbandes e.V. Hamburg
- WEDEKIND H. (1999): Fisch als Produkt der Binnenfischerei und seine Bedeutung als qualitativ hochwertiges Lebensmittel. In: R. Parzyk und H. Wedekind (Hrsg.): Tagungsband zum 3. Landesfischereitag des Landesfischereiverbandes Sachsen-Anhalt e.V. am 27.März 1999 in Lutherstadt-Wittenberg
- WEDEKIND H. UND K. SCHRECKENBACH (1996): Einfluss der Angelfischerei einschließlich der Behandlung nach dem Fang auf die Fleischqualität von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und Plötzen (*Rutilus rutilus*). Gutachten des Institut für Binnenfischerei e.V. Potsdam Sacrow
- WEICHART D. UND S. KJELLEBERG (1996): Stress resistance and recovery potential of culturable and viable but nonculturable cells *Vibrio vulnificus*. Microbiology, 142, 845-53
- WEMPE J.W. UND P.M. DAVIDSON (1992): Bacteriological profile and shelflife of white amur (*Ctenopharyngodon idella*). Journal Food Science, 57, 66-68, 102
- WENZEL S., R. BACH, G. MÜLLER-PRASUHN (1971): Teichforellen als Träger von *Clostridium botulinum* und Ursache von Botulismus. 4. Mitteilung: Kontaminationsquellen und -wege in Teichwirtschaften und

- Bearbeitungsbetrieben, Möglichkeiten zur Verbesserung der Hygiene. Arch. f. Lebensmittelhyg., 22 (6), 131-135
- WESTERDAHL A., J. CHRISTER-OLSON, S. KJELLEGBERG, P.L. CONWAY (1991): Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. Appl. Environ. Microbiol., 57, 2223-2228
- WINKLER H.M. UND H. THIEME (1978): Untersuchungen an den Zanderbeständen der Küstengewässer der DDR. Wiss. Z. Wilhelm-Pieck-Univ. Rostock, Math.-naturwiss. Reihe 27, 439-445
- WONG A.C. (1998): Biofilms in food processing environments. J. of dairy science, 81 (10), 2765-2779
- WYATT L.E., R. NICKELSON, C.V. VANDERZANT (1979): The occurrence and control of *Salmonella* in fresh water fish. J. of Food Science, 44, 1067-1069, 1073
- ZIEMKE F., M.G. HÖFLE, J. LALUCAT, R.ROSSELLÓ-MORA (1998): Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II *Shewanella baltica* sp. nov. Int. J. of Systematic Bacteriol., 48, 179-186

## 9 Gesetze und Normen

130. Verordnung über die hygienischen Anforderungen an Fischereierzeugnisse und lebende Muscheln (Fischhygiene-Verordnung-FischHV) vom 31. März 1994 (BGBl.I S.737), zuletzt geändert durch Art. 3 der V vom 23.06.2000.

Richtlinie des Rates vom 22. Juli 1991 zur Festlegung von Hygienevorschriften für die Erzeugung und die Vermarktung von Fischereierzeugnissen (91/493/EWG) ABl.Nr.L 268/15)

Verordnung (EWG) Nr. 2406/96 des Rates vom 26. November 1996 über gemeinsame Vermarktungsnormen für bestimmte Fischereierzeugnisse, Abl. der Europäischen Gemeinschaft Nr.L 334/1 vom 23.12.1996

Verordnung zum Schutz von Tieren im Zusammenhang mit der Schlachtung oder Tötung (Tierschutz-Schlachtverordnung - TierSchIV) vom 3. März 1997

1.Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz LMBG) In der Fassung der Bekanntmachung vom 9. September 1997; zul. geänd. durch Art. 5 7. Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes v. 25.2.1998. (BGBl. III/FNA 2125-40-1-2)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG.  
Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen. Bundesgesundheitsamt (Hrsg. u. Redakt.). Beuth Verlag GmbH, Berlin und Köln

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG.  
L 06.00-16: Untersuchung von Lebensmitteln, Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen, Vorbereitung der Proben (Mai 1983)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG.  
L 06.00-25: Untersuchung von Lebensmitteln, Bestimmung von *Enterobacteriaceae* in Fleisch; Tropfplatten-Verfahren (November 1987)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG.  
L 06.00-36: Untersuchung von Lebensmitteln, Bestimmung von *Escherichia coli* in Fleisch und Fleischerzeugnissen, Fluoreszensoptisches Koloniezählverfahren unter Verwendung von Membranfiltern-Spatelverfahren (Referenzverfahren) (Februar 1996)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG.  
L 06.00-39: Untersuchung von Lebensmitteln, Bestimmung von mesophilen sulfitreduzierenden Clostridien in Fleisch und Fleischerzeugnissen, Plattengußverfahren (Referenzverfahren) (Mai 1994)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG.  
L 00.00-20: Untersuchung von Lebensmitteln, Horizontales Verfahren für den Nachweis von Salmonellen (September 1998)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG.  
L 00.90-1: Untersuchung von Lebensmitteln, Sensorische Prüfung, Allgemeine Grundlagen, (Januar 1997)

---

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG.

L 00.90-6: Untersuchung von Lebensmitteln, Sensorische Prüfverfahren, Einfach beschreibende Prüfung (September 1997)

Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30°C-Tropfplatten-Verfahren, DIN 10 161 Teil 2, (November 1982)

Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes*.

Teil 1: Nachweisverfahren DIN EN ISO 11290-1 (März 1997)

Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes*.

Teil 2: Zählverfahren DIN EN ISO 11290-2 (August 1998)

MPN-Verfahren nach ISO 21528-2: 2000 (E) - Microbiology of food and animal feeding stuffs  
- Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*. Part 2:  
Detection and MPN technique without pre-enrichment-,

## 10 Anhang

Tabelle A M-1: Biochemische Differenzierungsreaktionen bei der Bestimmung von Aeromonaden in Zander- und Forellengewebe

Test	Reaktion
Oxidasetest	Zur Überprüfung der Oxidaseaktivität wurden Oxidaseteststäbchen von Merck verwendet. Eine violette Färbung der beimpften Stelle des Stäbchens zeigte eine positive Reaktion an.
Katalasetest	Eine isolierte Kolonie wurde auf einem Objektträger in einem Tropfen 3 %-iger Wasserstoffperoxidlösung suspendiert. Die sofortige Bildung von Gasblasen zeigt eine positive Reaktion an.
O/F-Test Test auf Oxidation/Fer- mentation von Kohlenhydraten	Für jede verdächtige Kolonie wurden 2 Röhrchen eingesetzt, ein Röhrchen wurde mit Paraffin überschichtet. Das stichbeimpfte Medium wurde 48 Stunden bei +30° C bebrütet. Ein fermentativer Kohlenhydratabbau wird durch den Farbumschlag beider Röhrchen von blau nach gelb angezeigt. Ein oxidativer Kohlenhydratabbau zeigt sich im Farbumschlag des unbedeckten Röhrchens nur an der Oberfläche oder im oberen Teil, während das bedeckte Röhrchen unverändert bleibt. Erfolgte kein Abbau des Kohlenhydrats, bleiben beide Röhrchen unverändert.
AHM	Es erfolgte eine Stichbeimpfung der Medien mit den verdächtigen Kolonien. Nach 24-48 Stunden bei + 30° C wird abgelesen. Folgende Reaktionen weisen auf bewegliche <i>Aeromonas</i> spp. hin: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gelbfärbung in der Tiefe mit einem purpurfarbenen Streifen an der Oberfläche des Agars (Mannit +, Inosit -, Ornithindecaboxylase -). Eine schwache Schwarzfärbung an der Agaroberfläche weist auf eine H<sub>2</sub>S-Bildung aus Cystein hin, ist aber nicht immer bei Aeromonaden vorhanden.</li> <li>• Die um den Impfstichkanal entstehende Trübung zeigt die Beweglichkeit an.</li> </ul>
Äsculin-Hydrolyse-Test	Nach Beimpfung mit der verdächtigen Kolonie wurde bei +30° C 24-48 Stunden bebrütet. Eine positive Reaktion zeigt sich in der Spaltung des Äsculins in Äsculetin unter Reduzierung des Eisensalzes, erkennbar an der Schwarzfärbung der Bouillon.
Zuckerverwertung in Hottinger-Bouillon	Nach Beimpfung mit der verdächtigen Kolonie erfolgte die Bebrütung bei +30° C bis zu 4 Tage. Durch Zuckerabbau (Glucose, Salicin, L-Arabinose) entsteht organische Säure. Dadurch sinkt der pH-Wert und es kommt zum Farbumschlag des Indikators Bromthymolblau von Blau nach Gelb. Ein eindeutiger Farbumschlag nach Gelb stellt eine positive Reaktion dar. Das aus dem Glucosestoffwechsel entstandene Gas wird in dem in das Nährmedium eingestellten Durhamröhrchen angezeigt.
Voges-Proskauer-Reaktion	Nach der Bebrütung der beimpften Röhrchen wurde 48 Stunden bei + 30° C bebrütet. Der Test beruht auf dem Nachweis von Acetylmethylcarbinol, einem Kohlenhydratstoffwechselprodukt, das in alkalischem Milieu eine Rotfärbung mit $\alpha$ -Naphthol bildet. Nach 48-stündiger Bebrütung wird von der VP-Bouillon 1 ml entnommen, 0,6 ml $\alpha$ -Naphthol und 0,2 ml 40 %-ige KOH hinzugefügt und gut durchmischt. Die Rotfärbung tritt nach 15-30 Minuten auf.
Lysin-Decarboxylase	Die Bebrütung dauerte bis zu 4 Tage bei + 30°C. Der durch den Indikator Bromkresolpurpur violett gefärbte Nährboden schlägt bei einem Glucoseabbau zunächst nach Gelb um. Durch den Glucoseabbau wird ein saures Milieu geschaffen, das die Decarboxylierung von L-Lysin begünstigt. Es entsteht NH <sub>3</sub> , was zur Erhöhung des pH-Wertes führt. Es tritt erneut eine Violett-Färbung der Bouillon auf. Eine negative Reaktion äußert sich im Bestehenbleiben der Gelbfärbung oder im Ausbleiben des Farbumschlages, da kein fermentativer Glucoseabbau stattgefunden hat.

Tabelle A M-2: Biochemische Differenzierungsreaktionen bei der Bestimmung von Vibrionen in Zandergewebe

Test	Reaktion
Kligler-Eisen	Nach der Beimpfung der Hochschichtröhrchen wurde 24 Stunden bei + 37°C bebrütet. Eine Identifizierung erfolgte auf der Basis einer zweifachen Zuckerverwertung und der Sulfid-Bildung mit Eisencitrat als Indikator für die H <sub>2</sub> S-Bildung. Die Kohlenhydratverwertung wird durch Säure- bzw. Alkalibildung in der Hochschicht und in der Schrägfläche und damit durch einen Farbumschlag angezeigt. Gelbe Hochschicht / rote Schrägschicht: Glucose-positiv, Lactose-negativ; gelbe Hochschicht / gelbe Schrägschicht: Glucose-positiv, Lactose-positiv; rote Hochschicht / rote Schrägschicht: Glucose-negativ, Lactose-negativ. Eine H <sub>2</sub> S-Bildung wird durch eine Schwärzung des gesamten oder eines Teiles der Hochschicht erkennbar. Zusätzlich kann eine Gasbildung durch Blasenbildung oder durch ein Aufreißen des Agars festgestellt werden.
ONPG (β-Galactosidase-Aktivität)	Für jeden Einzelnachweis wurde eine ONPG-Scheibe in ein steriles Röhrchen gegeben und 0,1 ml sterile Kochsalzlösung hinzugegeben. Etwas Zellmasse wurde im Röhrchen suspendiert. Die Röhrchen wurden bei + 37°C bebrütet und stündlich auf eine Farbveränderung begutachtet. Beim ONPG-Test ersetzt ein synthetisches Galactosid (o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid) das Substrat Lactose. Es wird wie Lactose durch die Galactosid-Permease in die Zelle hineingebracht und durch die β-Galactosidase hydrolysiert, und es entstehen die beiden Produkte Galactose und o-Nitrophenol, wobei das letztere gelb gefärbt ist. Eine Gelbfärbung zeigt einen positiven ONPG-Test an. Keime, die nach 6 Stunden keine positive Farbveränderung zeigen, sollten bis zu 24 Stunden weiter bebrütet werden.
O 129-Scheiben (10 und 150 µg)	Die Oberfläche einer Blutagar-Platte wurde gleichmäßig mit dem zu testenden Keim beimpft, und jeweils eine O129 -Scheibe mit 10 µg und eine mit 150 µg auf die Platte gelegt. Nach 24 Stunden Bebrütung bei + 37° C wurden die Platten auf Hemmhöfe begutachtet. Die O129 -Scheiben sind mit 10 µg bzw. 150 µg der vibriostatischen Substanz O129 (2,4-Diamino-6,7-diisopropyl-pteridin-phosphat) beladen. Der Grad der Empfindlichkeit variiert bei den einzelnen <i>Vibrio</i> -Arten.
Ornithindecaboxylase-Aktivität und Arginindihydrolase-Aktivität	Die Nährböden in den Röhrchen wurden beimpft, mit Paraffin überschichtet und bis zu 4 Tagen bei + 30°C bebrütet. Die Bouillon enthält Ornithin oder Arginin als Reaktionskörper und Bromkresolpurpur als pH-Indikator. Der Test ist nur für Mikroorganismen geeignet, die Glucose unter Säurebildung verwerten können. Zunächst wird Glucose zu Säure abgebaut. Bei einem pH-Wert unter 5,6 schlägt die Farbe des pH-Indikators nach Gelb um. Ornithindecaboxylase-positive bzw. Arginindihydrolase-positive Bakterien bewirken durch den Abbau von Ornithin bzw. Arginin danach wieder einen pH-Anstieg. Die Nährböden färben sich violett.



Tabelle A M-3: Biochemische Differenzierungsreaktionen bei der Bestimmung von *Listeria* spp. und der Speziesdifferenzierung von *Listeria monocytogenes*

Test	Reaktion
Reaktionen zur Gattungsdifferenzierung von <i>Listeria</i> spp.	
Katalasetest	Eine isolierte Kolonie wurde auf einem Objektträger in einem Tropfen 3 %-iger Wasserstoffperoxidlösung suspendiert. Die sofortige Bildung von Gasblasen zeigt eine positive Reaktion an.
Gramfärbung	Die Gramfärbung wurde mit einer isolierten Kolonie durchgeführt und diente zur Beurteilung des Gramverhaltens und der Bakterienmorphologie. <i>Listeria</i> spp. sind gram-positiv dünne kurze Stäbchen.
Beweglichkeitsprüfung	Eine Kolonie wurde von TSYE-Agar abgenommen, in TSYE-Bouillon suspendiert und 8 bis 24 Stunden bei +25°C bebrütet. Das Beweglichkeitsmedium im Röhrchen wurde mit einer Kultur aus der TSYE-Bouillon mit Hilfe einer Impfnadel beimpft und 48 Stunden im Brutschrank bei +25°C bebrütet. Das Wachstum um den Einstich wird geprüft. <i>Listeria</i> spp. sind beweglich und zeigen ein typisches schirmförmiges Wachstum.
Reaktionen zur Speziesdifferenzierung von <i>Listeria monocytogenes</i>	
Hämolyse	Zur Bestimmung der Hämolyse-Reaktion wurden Schafblutagar-Platten beimpft. Mit einer Impfnadel wurden die verdächtigen Kulturen in die Agarplatte gestochen. Gleichzeitig dienten <i>L.monocytogenes</i> - und <i>L.innocua</i> -Stämme als positive bzw. negative Kontrollen. Nach 24 Stunden Bebrütung zeigte <i>L.monocytogenes</i> eine enge, klare, helle Zone ( $\beta$ -Hämolyse) und <i>L.innocua</i> keine klare Zone.
Kohlenhydratabbau	Jede Kohlenhydratbouillon (Xylose und Rhamnose) wurde beimpft und bis zu 5 Tagen bei + 37°C bebrütet. Positive Reaktionen (Säurebildung) werden durch eine Gelbfärbung angezeigt.
CAMP-Test	Zwischen den senkrecht auf einer Schafblutagarplatte ausgestrichenen <i>Staphylococcus aureus</i> - und <i>Rhodococcus equi</i> -Stämmen wurden die verdächtigen Prüfstämme waagerecht aufgetragen. <i>L.monocytogenes</i> Stämme lassen sich durch verstärkte $\beta$ -Hämolysezone in der Nähe des <i>Staph.aureus</i> -Impfstriches erkennen, diese Hämolyse ist ebenso bei <i>L.seeligeri</i> zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu bildet <i>L.innocua</i> keinerlei Hämolysezonen aus, und <i>L.ivanovii</i> zeigt eine typische pfeilförmige Hämolyse in der Nähe des <i>Rh.equi</i> Impfstriches.

Tabelle A E-1: Winterversuche 1999, Gesamtkeimzahlen in log KbE/g in der Rückenmuskulatur ausgenommener Regenbogenforellen

Fisch		Lagerungstage				
		0	7	10	13	15
Versuch I	1	3,00	3,00	4,37	5,26	5,55
	2	3,73	2,30	4,75	5,08	5,87
	3	3,30	2,30	4,44	5,02	6,03
	4	3,00	2,30	4,59	4,99	6,05
	5	3,20	3,85	4,83	4,40	6,20
MW 1		3,25	2,75	4,60	4,95	5,94
StAbw 1		0,30	0,69	0,20	0,32	0,25
Versuch II	1	3,28	3,00	3,00	3,93	6,00
	2	3,16	2,30	3,26	3,56	5,41
	3	3,00	3,00	3,23	4,41	5,79
	4	3,28	3,00	6,32	7,59	7,23
	5	3,00	2,3	3,63	3,65	6,05
MW 2		3,14	2,83	3,89	4,63	6,10
StAbw 2		0,14	0,38	1,38	1,69	0,68
Versuch III	1	3,43	3,00	4,72	5,26	6,93
	2	3,73	3,64	5,46	5,60	6,54
	3	3,53	4,00	5,71	5,46	7,01
	4	3,43	3,04	7,81	8,94	6,59
	5	3,98	3,34	5,73	6,08	6,95
MW 3		3,62	3,40	5,89	6,27	6,80
StAbw 3		0,24	0,42	1,15	1,52	0,22
Versuch IV	1	3,00	3,15	4,03	5,52	n.u.
	2	3,85	3,98	4,80	4,00	n.u.
	3	4,02	3,00	4,23	5,51	n.u.
	4	3,58	3,00	4,11	5,36	n.u.
	5	3,55	3,00	4,34	4,93	n.u.
MW 4		3,60	3,23	4,30	5,06	
StAbw 4		0,39	0,43	0,30	0,64	
Gesamtmittelwert		3,40	3,03	4,67	5,23	6,28
Standardabw.		0,34	0,55	1,14	1,27	0,56

n.u.: nicht untersucht, MW = Mittelwert, StAbw. = Standardabweichung

Wenn keine Kolonien auf den Platten gewachsen sind, wurde statt der Nullwerte die Nachweisgrenze von log 2,30 KbE/g und cm<sup>2</sup> angegeben. Laut Methode beträgt die Quantifizierungsgrenze log 3,0 KbE/g und cm<sup>2</sup>

Tabelle A E-2: Winterversuche 1999, Gesamtkeimzahlen in log KbE/g in der Rückenmuskulatur runder Regenbogenforellen

Fisch		Lagerungstage				
		0	7	10	13	15
Versuch I	1	3,00	2,30	3,91	4,48	4,73
	2	3,00	2,30	4,57	4,04	5,28
	3	3,45	2,30	3,00	4,08	5,92
	4	3,00	3,30	3,91	4,20	6,51
	5	3,00	3,30	3,91	4,95	6,24
MW 1		3,09	2,70	3,86	4,35	5,74
StAbw 1		0,20	0,55	0,56	0,38	0,73
Versuch II	1	3,00	3,00	3,00	2,65	6,2
	2	3,00	3,34	3,00	3,36	4,82
	3	3,21	3,00	3,13	3,48	5,87
	4	3,68	3,00	3,90	4,18	5,55
	5	3,54	3,00	3,11	4,76	6,45
MW 2		3,286	3,07	3,23	3,69	5,78
StAbw 2		0,31	0,15	0,38	0,81	0,63
Versuch III	1	3,45	3,60	5,08	5,97	6,45
	2	3,93	4,01	4,72	5,66	7,03
	3	4,68	3,00	5,04	6,61	7,81
	4	3,87	3,00	6,13	6,74	6,77
	5	3,75	3,00	5,99	6,43	6,3
MW 3		3,94	3,32	5,39	6,28	6,87
StAbw 3		0,46	0,46	0,63	0,45	0,60
Versuch IV	1	3,94	3,00	n.a.	5,30	n.u.
	2	3,36	3,00	5,46	n.a.	n.u.
	3	3,92	3,00	4,80	6,20	n.u.
	4	3,71	3,26	n.a.	5,61	n.u.
	5	3,42	3,00	n.a.	6,38	n.u.
MW 4		3,67	3,05	5,13	5,87	
StAbw 4		0,27	0,12	0,47	0,50	
Gesamtmittelwert		3,50	3,04	4,27	5,00	6,13
Standardabw.		0,45	0,41	1,05	1,22	0,81

n.u.: nicht untersucht, MW = Mittelwert, StAbw. = Standardabweichung

Tabelle A E-3: Winterversuche 1999, Gesamtkeimzahlen in log KbE/cm<sup>2</sup> auf der Haut ausgenommener Regenbogenforellen

Fisch		Lagerungstage				
		0	7	10	13	15
Versuch I	1	3,88	3,60	5,05	6,28	6,32
	2	3,00	3,82	5,34	6,00	6,48
	3	3,93	3,70	5,23	5,74	7,16
	4	3,78	3,30	5,11	6,00	6,74
	5	3,96	3,90	5,32	5,54	6,57
MW 1		3,71	3,66	5,21	5,91	6,65
StAbw 1		0,40	0,23	0,13	0,28	0,32
Versuch II	1	3,16	2,30	3,38	5,11	6,2
	2	3,21	3,00	3,80	4,71	6,26
	3	3,62	3,42	3,79	4,89	6,51
	4	3,00	3,00	6,17	7,45	7,76
	5	3,46	3,00	4,20	5,46	6,3
MW 2		3,29	2,94	4,27	5,52	6,61
StAbw 2		0,25	0,40	1,10	1,11	0,66
Versuch III	1	3,30	3,64	6,65	6,36	8,00
	2	4,05	4,71	6,36	6,49	7,45
	3	3,58	5,36	5,53	6,85	8,15
	4	3,94	4,3	8,08	8,57	7,61
	5	3,46	3,71	6,87	6,91	7,74
MW 3		3,67	4,34	6,70	7,04	7,79
StAbw 3		0,32	0,72	0,92	0,89	0,28
Versuch IV	1	4,26	4,02	5,45	6,83	n.u.
	2	3,71	2,3	5,78	5,09	n.u.
	3	4,03	3,6	5,17	7,00	n.u.
	4	4,76	2,3	4,64	5,88	n.u.
	5	4,41	2,3	5,48	5,9	n.u.
MW 4		4,23	2,90	5,30	6,14	
StAbw 4		0,40	0,84	0,43	0,78	
Gesamtmittelwert		3,73	3,46	5,37	6,15	7,02
Standardabw.		0,47	0,82	1,13	0,95	0,70

n.u.: nicht untersucht, MW = Mittelwert, StAbw. = Standardabweichung

Tabelle A E-4: Winterversuche 1999, Gesamtkeimzahlen in log KbE/cm<sup>2</sup> auf der Haut runder Regenbogenforellen

Fisch		Lagerungstage				
		0	7	10	13	15
Versuch I	1	3,21	2,30	4,61	5,08	5,98
	2	3,00	3,82	5,08	5,17	6,22
	3	3,16	2,30	3,65	5,89	6,54
	4	3,87	3,30	5,34	4,62	5,91
	5	3,00	3,42	4,45	4,9	6,83
MW 1		3,25	3,03	4,63	5,13	6,30
StAbw 1		0,36	0,69	0,65	0,47	0,39
Versuch II	1	3,74	3,15	3,04	3,41	6,15
	2	3,28	3,26	4,2	4,86	4,82
	3	3,73	3,60	3,73	4,18	5,66
	4	3,00	3,51	4,87	4,65	6,46
	5	3,72	3,18	4,11	3,26	6,61
MW 2		3,49	3,34	3,99	4,07	5,94
StAbw 2		0,34	0,20	0,67	0,72	0,72
Versuch III	1	3,61	4,34	6,71	7,28	7,75
	2	4,00	4,13	6,28	6,95	7,81
	3	3,94	3,82	5,95	7,91	8,41
	4	4,02	3,50	6,64	7,88	8,45
	5	3,99	3,75	7,02	6,89	7,7
MW 3		3,91	3,91	6,52	7,38	8,02
StAbw 3		0,17	0,33	0,41	0,49	0,37
Versuch IV	1	3,91	3,62	4,62	6,85	n.u.
	2	3,97	n.a.	6,78	7,03	n.u.
	3	4,06	3,00	n.a.	7,00	n.u.
	4	4,12	3,48	n.a.	7,08	n.u.
	5	4,69	3,00	n.a.	6,78	n.u.
MW 4		4,15	3,28	5,7	6,95	
StAbw 4		0,31	0,32	1,53	0,13	
Gesamtmittelwert		3,70	3,39	5,12	5,88	6,75
Standardabw.		0,46	0,52	1,24	1,45	1,06

n.u.: nicht untersucht, n.a.: nicht auswertbar, MW = Mittelwert, StAbw. = Standardabweichung

Tabelle A E-5: Winterversuche 1999, Gehalt an Pseudomonaden in log KbE/g in der Rückenmuskulatur ausgenommener Regenbogenforellen

		Lagerungstage				
	Fische	0	7	10	13	15
Versuch I	1	3,00	3,00	4,45	4,96	5,84
	2	3,00	3,00	4,71	5,03	6,07
	3	3,00	2,30	4,68	3,00	6,09
	4	3,00	3,00	4,65	5,08	5,93
	5	3,00	3,00	4,65	4,55	6,53
MW 1		3,00	2,86	4,63	4,52	6,09
StAbw 1		0,00	0,31	0,10	0,88	0,27
Versuch II	1	2,30	2,30	3,16	3,51	6,06
	2	3,00	2,30	3,36	3,92	5,60
	3	2,30	3,00	3,44	4,58	5,74
	4	2,30	2,30	3,80	4,05	7,15
	5	2,30	2,30	3,72	3,71	6,21
MW 2		2,44	2,44	3,50	3,95	6,15
StAbw 2		0,31	0,31	0,26	0,41	0,61
Versuch III	1	3,00	3,00	4,79	5,81	7,01
	2	3,08	3,61	5,11	5,89	6,50
	3	3,00	3,72	5,68	5,50	7,06
	4	3,00	3,00	5,00	5,58	6,57
	5	3,00	3,09	5,71	6,26	6,89
MW 3		3,02	3,28	5,26	5,81	6,81
StAbw 3		0,04	0,35	0,42	0,30	0,26
Versuch IV	1	2,30	3,00	4,11	5,54	n.u.
	2	3,00	3,95	4,65	3,93	n.u.
	3	3,00	3,00	4,11	5,48	n.u.
	4	3,00	3,00	4,26	5,44	n.u.
	5	2,30	2,30	4,34	6,82	n.u.
MW 4		2,72	3,05	4,29	5,44	
StAbw 4		0,38	0,59	0,22	1,02	
Gesamtmittelwert		2,79	2,91	4,42	4,93	6,35
Standardabw.		0,33	0,49	0,70	1,00	0,51

n.u.: nicht untersucht, MW = Mittelwert, StAbw. = Standardabweichung

Tabelle A E-6: Winterversuche 1999, Gehalt an Pseudomonaden in log KbE/g in der Rückenmuskulatur runder Regenbogenforellen

Fische		Lagerungstage				
		0	7	10	13	15
Versuch I	1	2,30	3,00	3,73		4,77
	2	2,30	2,30	3,00	4,85	5,67
	3	2,30	3,00	3,00	3,85	5,61
	4	2,30	3,00	3,43	3,74	5,68
	5	2,30	2,30	3,65	4,65	5,59
MW 1		2,30	2,72	3,36	4,27	5,46
StAbw 1		0,00	0,38	0,35	0,56	0,39
Versuch II	1	2,30	3,00	3,00	3,00	5,57
	2	2,30	3,00	3,04	3,50	4,87
	3	3,00	2,30	3,18	3,78	5,46
	4	2,30	3,00	4,05	4,38	5,41
	5	3,00	3,00	3,37	4,65	6,82
MW 2		2,58	2,86	3,33	3,86	5,63
StAbw 2		0,38	0,31	0,43	0,67	0,72
Versuch III	1	3,00	3,58	5,46	6,51	6,70
	2	3,15	3,67	5,04	5,92	7,04
	3	3,51	2,30	4,94	6,76	7,96
	4	3,07	3,00	5,94	6,94	6,83
	5	3,00	2,30	6,43	5,95	6,40
MW 3		3,15	2,97	5,56	6,42	6,99
StAbw 3		0,21	0,66	0,63	0,47	0,59
Versuch IV	1	3,00	2,30	3,62	5,36	n.u.
	2	2,30	3,00	5,62	5,68	n.u.
	3	3,00	3,00	4,43	5,84	n.u.
	4	3,00	2,30	4,45	5,63	n.u.
	5	3,00	3,00	4,78	5,67	n.u.
MW 4		2,86	2,72	4,58	5,64	
StAbw 4		0,31	0,38	0,72	0,17	
Gesamtmittelwert		2,72	2,82	4,21	5,09	6,03
Standardabw.		0,41	0,43	1,08	1,16	0,89

n.u.: nicht untersucht, MW = Mittelwert

Tabelle A E-7: Winterversuche 1999, Gehalt an Pseudomonaden in log KbE/cm<sup>2</sup> auf der Haut ausgenommener Regenbogenforellen

Fische		Lagerungstage				
		0	7	10	13	15
Versuch I	1	3,15	3,06	5,08	6,26	6,83
	2	3,00	3,43	5,63	5,90	6,63
	3	3,30	3,10	5,20	5,87	7,26
	4	3,04	3,23	5,22	5,97	6,93
	5	3,37	3,00	5,23	5,74	7,05
MW 1		3,17	3,16	5,27	5,95	6,94
StAbw 1		0,16	0,17	0,21	0,19	0,24
Versuch II	1	3,00	3,00	3,40	4,93	6,41
	2	3,00	3,00	3,87	4,83	6,42
	3	2,30	3,00	3,76	4,84	6,53
	4	2,30	3,00	4,04	4,83	7,92
	5	2,30	3,00	4,34	5,30	6,76
MW 2		2,58	3,00	3,88	4,95	6,81
StAbw 2		0,38	0,00	0,35	0,20	0,64
Versuch III	1	3,00	3,57	6,81	6,79	8,00
	2	3,28	4,64	6,34	6,86	7,51
	3	3,00	5,36	5,75	6,95	8,12
	4	3,26	4,06	6,32	6,89	7,65
	5	3,02	3,85	6,83	6,91	7,54
MW 3		3,11	4,30	6,41	6,88	7,76
StAbw 3		0,14	0,71	0,44	0,06	0,28
Versuch IV	1	3,08	3,72	5,40	6,82	n.u.
	2	3,00	3,70	5,81	5,18	n.u.
	3	3,00	3,51	5,38	7,00	n.u.
	4	3,48	3,00	4,70	5,08	n.u.
	5	3,08	n.a.	5,08	6,28	n.u.
MW 4		3,13	3,48	5,27	6,07	
StAbw 4		0,20	0,34	0,41	0,90	
Gesamtmittelwert		3,00	3,49	5,21	5,96	7,17
Standardabw.		0,33	0,64	0,98	0,83	0,59

n.u.: nicht untersucht, MW = Mittelwert



Tabelle A E-8: Winterversuche 1999, Gehalt an Pseudomonaden in log KbE/cm<sup>2</sup> auf der Haut runder Regenbogenforellen

Fische		Lagerungstage				
		0	7	10	13	15
Versuch I	1	3,00	3,00	4,59	5,04	5,46
	2	2,30	3,00	4,80	5,11	6,02
	3	2,30	3,00	3,45	5,85	5,28
	4	3,00	3,00	4,88	4,14	5,81
	5	3,00	3,04	4,30	5,79	6,92
MW 1		2,72	3,01	4,40	5,19	5,90
StAbw 1		0,38	0,02	0,58	0,69	0,64
Versuch II	1	3,00	3,00	3,02	3,41	6,48
	2	3,00	3,00	4,18	5,45	5,16
	3	3,00	3,34	3,78	4,51	5,55
	4	3,00	3,16	4,87	4,80	6,50
	5	3,00	3,00	4,18	3,42	6,76
MW 1		3,00	3,10	4,01	4,32	6,09
StAbw 1		0,00	0,15	0,68	0,89	0,69
Versuch III	1	3,00	4,53	6,61	7,20	7,60
	2	3,23	4,01	6,45	7,54	7,89
	3	3,23	3,56	6,18	7,91	8,49
	4	3,19	3,30	6,63	7,87	8,51
	5	3,00	3,30	7,05	6,98	7,83
MW 1		3,13	3,74	6,58	7,50	8,06
StAbw 1		0,12	0,53	0,32	0,41	0,41
Versuch IV	1	3,11	3,30	4,80	6,57	n.u.
	2	3,00	3,60	6,87	6,99	n.u.
	3	3,04	3,00	6,30	6,97	n.u.
	4	3,08	3,11	4,92	6,93	n.u.
	5	3,00	3,08	6,86	6,84	
MW 1		3,05	3,22	5,95	6,86	
StAbw 1		0,05	0,24	1,02	0,17	
Gesamtmittelwert		2,97	3,27	5,24	5,97	6,68
Standardabw.		0,24	0,40	1,27	1,42	1,15

n.u.: nicht untersucht, MW = Mittelwert

Tabelle A E-9: Sommerversuche 2001 -Versuch Nr. 1, Gesamtkeimzahl, Gehalt an Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae* in log KbE/cm<sup>2</sup> auf der Haut ausgenommener Regenbogenforellen

Sommer- versuch 1	HAUT leer Fische	Lagerungsstage				
		1	4	7	11	13
GKZ	1	3,56	3,88	5,25	6,37	7,09
	2	4,11	4,06	4,85	6,80	7,52
	3	3,89	4,46	4,89	7,35	7,83
	4	3,66	4,06	4,79	7,08	7,73
	5	3,52	3,46	4,56	7,20	7,57
	MW	<b>3,75</b>	<b>3,98</b>	<b>4,87</b>	<b>6,96</b>	<b>7,55</b>
	StAbw.	<b>0,25</b>	<b>0,36</b>	<b>0,25</b>	<b>0,39</b>	<b>0,28</b>
Pseudom.	1	3,30	3,30	4,90	6,18	n.u.
	2	3,30	3,40	4,53	6,18	n.u.
	3	3,30	3,54	4,65	6,18	n.u.
	4	3,30	3,60	4,72	6,18	n.u.
	5	3,30	3,30	5,02	6,18	n.u.
	MW	<b>3,30</b>	<b>3,43</b>	<b>4,76</b>	<b>6,18</b>	
	StAbw.	<b>0,00</b>	<b>0,14</b>	<b>0,20</b>	<b>0,00</b>	
Enterobact.	1	3,30	2,00	3,30	3,53	n.u.
	2	3,30	3,30	3,30	3,95	n.u.
	3	3,30	3,30	3,30	4,99	n.u.
	4	3,30	3,30	3,30	4,73	n.u.
	5	2,00	3,30	3,30	4,77	n.u.
	MW	<b>3,04</b>	<b>3,04</b>	<b>3,30</b>	<b>4,39</b>	
	StAbw.	<b>0,58</b>	<b>0,58</b>	<b>0,00</b>	<b>0,62</b>	

n.u.: nicht untersucht, MW = Mittelwert, StAbw. = Standardabweichung

Tabelle A E-10: Sommerversuche 2001 -Versuch Nr. 1, Gesamtkeimzahl, Gehalt an Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae* in log KbE/cm<sup>2</sup> auf der Haut runder Regenbogenforellen

Sommer- versuch 1	HAUT rund Fische	Lagerungsstage				
		1	4	7	11	13
GKZ	1	3,30	4,69	5,56	4,98	6,77
	2	3,30	3,18	4,47	5,98	6,78
	3	3,58	3,66	5,02	5,73	6,81
	4	4,09	0,08	4,74	5,71	6,44
	5	3,34	3,60	5,25	6,51	6,24
	MW	<b>3,52</b>	<b>3,04</b>	<b>5,01</b>	<b>5,78</b>	<b>6,61</b>
	StAbw.	<b>0,34</b>	<b>1,75</b>	<b>0,43</b>	<b>0,55</b>	<b>0,26</b>
Pseudom.	1	2,00	3,40	6,42	6,19	n.u.
	2	3,30	2,00	4,35	5,93	n.u.
	3	3,30	3,54	4,98	5,70	n.u.
	4	3,30	3,98	5,27	5,75	n.u.
	5	3,30	3,30	5,98	6,18	n.u.
	MW	<b>3,04</b>	<b>3,24</b>	<b>5,40</b>	<b>5,95</b>	
	StAbw.	<b>0,58</b>	<b>0,74</b>	<b>0,82</b>	<b>0,23</b>	
Enterobact.	1	2,00	3,30	3,30	3,30	n.u.
	2	2,00	3,30	3,30	3,30	n.u.
	3	3,30	2,00	3,30	3,30	n.u.
	4	2,00	3,30	3,26	3,89	n.u.
	5	3,30	3,30	3,21	4,48	n.u.
	MW	<b>2,52</b>	<b>3,04</b>	<b>3,27</b>	<b>3,65</b>	
	StAbw.	<b>0,71</b>	<b>0,58</b>	<b>0,04</b>	<b>0,53</b>	

n.u.: nicht untersucht, MW = Mittelwert, StAbw. = Standardabweichung

Tabelle A E-11: Sommerversuche 2001 -Versuch Nr. 1, Gesamtkeimzahl, Gehalt an Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae* in log KbE/g im Darm runder Regenbogenforellen

Sommer- versuch 1	DARM Fische	Lagerungstage				
		1	4	7	11	13
GKZ	1	5,05	5,98	5,70	6,53	7,80
	2	5,00	3,97	5,90	6,16	6,68
	3	4,21	4,30	5,40	6,59	7,65
	4	2,00	6,25	6,87	7,66	7,54
	5	6,59	6,30	6,63	8,18	7,09
	MW	4,57	5,36	6,10	7,02	7,35
	StAbw.	1,68	1,13	0,63	0,85	0,46
Pseudom.	1	3,08	2,00	2,00	n.a.	n.u.
	2	4,17	2,00	2,00	n.a.	n.u.
	3	4,70	2,00	2,00	n.a.	n.u.
	4	3,50	2,00	6,00	n.a.	n.u.
	5	5,48	2,00	5,02	n.a.	n.u.
	MW	4,19	2,00	3,40		
	StAbw.	0,95	0,00	1,95		
Enterobact.	1	3,43	3,66	4,30	6,08	n.u.
	2	3,93	3,63	4,69	5,37	n.u.
	3	2,00	2,00	2,00	2,00	n.u.
	4	2,00	4,30	4,30	7,55	n.u.
	5	4,86	3,30	5,13	7,18	n.u.
	MW	3,24	3,38	4,08	5,64	
	StAbw.	1,25	0,85	1,21	2,21	

n.u.: nicht untersucht, n.a.: nicht auswertbar, MW = Mittelwert, StAbw.= Standardabweichung

Tabelle A E-12: Sommerversuche 2001 -Versuch Nr. 1, Gesamtkeimzahl, Gehalt an Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae* in log KbE/g im Bauchlappengewebe runder Regenbogenforellen

Sommer- versuch 1	BL rund Fische	Lagerungstage				
		1	4	7	11	13
GKZ	1	2,00	2,00	3,30	3,30	3,00
	2	2,00	2,00	2,00	3,32	4,16
	3	2,00	2,00	2,00	3,30	3,30
	4	2,00	2,00	2,00	4,83	3,30
	5	3,30	3,30	3,30	5,16	3,95
	MW	2,26	2,26	2,52	3,98	3,54
	StAbw.	0,58	0,58	0,71	0,93	0,49
Pseudom.	1	2,00	2,00	3,30	3,00	n.u.
	2	2,00	2,00	2,00	3,30	n.u.
	3	2,00	2,00	2,00	2,00	n.u.
	4	2,00	2,00	2,00	2,00	n.u.
	5	2,00	2,00	2,00	4,06	n.u.
	MW	2,00	2,00	2,26	2,87	
	StAbw.	0,00	0,00	0,58	0,88	
Enterobact.	1	2,00	2,00	2,00	2,00	n.u.
	2	2,00	2,00	2,00	3,30	n.u.
	3	2,00	2,00	2,00	2,00	n.u.
	4	2,00	2,00	2,00	3,30	n.u.
	5	2,00	2,00	2,00	2,00	n.u.
	MW	2,00	2,00	2,00	2,52	
	StAbw.	0,00	0,00	0,00	0,71	

Tabelle A E-13: Sommerversuche 2001 -Versuch Nr. 1, Gesamtkeimzahl, Gehalt an Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae* in log KbE/g im Bauchlappengewebe ausgenommener Regenbogenforellen

Sommer- versuch 1	BL leer Fische	Lagerungstage				
		1	4	7	11	13
<b>GKZ</b>	1	4,02	4,52	6,16	6,10	5,40
	2	5,26	4,88	5,04	6,16	6,42
	3	5,74	4,51	4,00	7,25	7,45
	4	5,51	4,69	6,08	7,18	6,85
	5	3,30	4,89	4,95	6,73	6,36
	<b>MW</b>	<b>4,77</b>	<b>4,70</b>	<b>5,25</b>	<b>6,68</b>	<b>6,50</b>
	<b>StAbw.</b>	<b>1,05</b>	<b>0,19</b>	<b>0,90</b>	<b>0,54</b>	<b>0,75</b>
<b>Pseudom.</b>	1	3,30	3,65	4,88	5,98	n.u.
	2	3,80	4,23	4,76	6,28	n.u.
	3	3,57	4,51	3,48	7,21	n.u.
	4	3,89	3,74	5,99	7,18	n.u.
	5	3,30	4,21	4,39	7,05	n.u.
	<b>MW</b>	<b>3,57</b>	<b>4,07</b>	<b>4,70</b>	<b>6,74</b>	
	<b>StAbw.</b>	<b>0,27</b>	<b>0,36</b>	<b>0,91</b>	<b>0,57</b>	
<b>Enterobact.</b>	1	3,30	3,30	4,15	5,22	n.u.
	2	2,00	3,30	3,30	4,92	n.u.
	3	3,30	3,30	3,30	5,10	n.u.
	4	3,30	3,44	3,75	5,18	n.u.
	5	2,00	3,43	3,30	5,21	n.u.
	<b>MW</b>	<b>2,78</b>	<b>3,35</b>	<b>3,56</b>	<b>5,13</b>	
	<b>StAbw.</b>	<b>0,71</b>	<b>0,07</b>	<b>0,38</b>	<b>0,12</b>	

n.u.: nicht untersucht, MW = Mittelwert, StAbw. = Standardabweichung

Tabelle A E-14: Sommerversuche 2001, Versuche Nr. 2 und 3, Gesamtkeimzahl in log KbE/g im Darm runder Regenbogenforellen

DARM	Fische	Lagerungstage									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Versuch 2	1	3,30	4,88	3,65	n.u.	5,37	3,54	5,21	5,57	3,70	n.u.
	2	3,30	3,30	3,34	n.u.	4,39	4,09	5,00	4,37	4,64	n.u.
	3	6,66	3,30	4,14	n.u.	3,70	3,37	3,33	4,69	7,64	n.u.
	4	3,30	3,30	4,50	n.u.	4,35	4,25	5,36	5,04	4,09	n.u.
	5	3,41	3,30	5,64	n.u.	4,03	6,18	4,31	3,38	6,05	n.u.
	6	4,19	4,55	3,36	n.u.		5,91	3,74	4,03	5,53	n.u.
	7	4,69	3,30	3,98	n.u.	3,30	5,58	6,98	7,50	6,88	n.u.
	8	4,81	3,98	3,49	n.u.	3,30	6,13	4,73	4,50	3,48	n.u.
	9	3,30	3,30	3,30	n.u.	5,85	4,67	3,89	5,72	5,87	n.u.
	10	5,56	3,93	3,30	n.u.	4,27	4,37	3,92	5,54	3,98	n.u.
	MW	4,25	3,71	3,87		4,28	4,81	4,65	5,03	5,19	
	StAbw.	1,17	0,60	0,75		0,87	1,06	1,06	1,14	1,43	
Versuch 3	1	3,34	n.u.	n.u.	5,28	n.u.	n.u.	4,21	n.u.	n.u.	6,85
	2	5,10	n.u.	n.u.	4,69	n.u.	n.u.	6,98	n.u.	n.u.	5,26
	3	3,52	n.u.	n.u.	3,69	n.u.	n.u.	3,30	n.u.	n.u.	7,24
	4	4,14	n.u.	n.u.	3,30	n.u.	n.u.	4,43	n.u.	n.u.	5,07
	5	4,90	n.u.	n.u.	5,08	n.u.	n.u.	3,30	n.u.	n.u.	6,77
	6	4,70	n.u.	n.u.	6,14	n.u.	n.u.	5,46	n.u.	n.u.	4,75
	7	4,46	n.u.	n.u.	5,65	n.u.	n.u.	6,33	n.u.	n.u.	5,88
	8	4,91	n.u.	n.u.	5,02	n.u.	n.u.	7,34	n.u.	n.u.	5,30
	9	5,61	n.u.	n.u.	5,53	n.u.	n.u.	3,30	n.u.	n.u.	5,02
	10	4,77	n.u.	n.u.	5,76	n.u.	n.u.	4,78	n.u.	n.u.	5,75
	MW	4,55			5,01			4,94			5,79
	StAbw.	0,70			0,90			1,53			0,88

n.u.: nicht untersucht, MW = Mittelwert, StAbw. = Standardabweichung

Tabelle A E-15: Sommerversuche 2001, Versuche Nr. 2 und 3, Gesamtkeimzahl in log KbE/g im Bauchlappengewebe leerer und runder Regenbogenforellen, n.u.: nicht untersucht, MW = Mittelwert, StAbw. = Standardabweichung (siehe folgende Seite)

BL rund	Fische	Lagerungstage									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Versuch 2	1	2,00	2,00	2,00	n.u.	2,00	2,00	2,00	3,30	2,00	n.u.
	2	3,30	2,00	2,00	n.u.	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	n.u.
	3	3,30	2,00	2,00	n.u.	2,00	2,00	3,30	3,30	3,30	n.u.
	4	2,00	2,00	2,00	n.u.	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	n.u.
	5	3,30	2,00	3,30	n.u.	2,00	2,00	2,00	2,00	3,30	n.u.
	6	2,00	2,00	2,00	n.u.	2,00	2,00	2,00	2,00	3,30	n.u.
	7	2,00	2,00	2,00	n.u.	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	n.u.
	8	2,00	2,00	2,00	n.u.	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	n.u.
	9	2,00	2,00	2,00	n.u.	2,00	2,00	2,00	3,30	2,00	n.u.
	10	2,00	2,00	2,00	n.u.	3,30	2,00		2,00	3,30	n.u.
	MW	2,39	2,00	2,13		2,13	2,00	2,14	2,39	2,52	
	StAbw.	0,63	0,00	0,41		0,41	0,00	0,43	0,63	0,67	
Versuch 3	1	1,60	n.u.	n.u.	1,90	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	2,82
	2	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	1,60
	3	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	2,41
	4	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	2,53
	5	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	4,26
	6	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	1,60
	7	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	2,96
	8	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	1,60
	9	1,60	n.u.	n.u.	2,41	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	1,60
	10	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	1,60	n.u.	n.u.	
	MW	1,60			1,71			1,60			2,38
	StAbw.	0,00			0,26			0,00			0,90

BL leer	Fische	Lagerungstage									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Versuch 3	1	2,00	n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	4,58
	2	2,00	n.u.	n.u.	3,30	n.u.	n.u.	3,30	n.u.	n.u.	4,12
	3	2,00	n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	4,26
	4	2,00	n.u.	n.u.	3,30	n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	3,30
	5	2,00	n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	4,34
	6	2,00	n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	3,30	n.u.	n.u.	4,29
	7	3,30	n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	3,30	n.u.	n.u.	4,46
	8	2,00	n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	3,30
	9	2,00	n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	4,53
	10	2,00	n.u.	n.u.		n.u.	n.u.	2,00	n.u.	n.u.	4,88
	MW	2,13			2,29			2,39			4,21
	StAbw.	0,41			0,57			0,63			0,52

Tabelle A E-16: Sommersversuche 2001 -Versuch Nr. 1, Differenzierung verschiedener auf VRBG-Agar gewachsener Keime aus Darm-, Bauchlappen- und Haut-Proben von Regenbogenforellen, D = Darm, BL = Bauchlappen, H = Haut, Ox = Oxidasetest, Kat = Katalaseaktivität, Bew. = Beweglichkeit, Stäb. = Stäbchenbakterien, kl. = klein, O/F = oxidativer/fermentativer Glucoseabbau

Probe	auf VRBG	auf Blutagar	Gram- KOH-Test	Ox	Kat	O/F	Bew.	Api 20 E	Gramfärbung
D	groß, erhaben. weißlichgelb	groß, grauweiß, glänzend	(-), kl. kurze Stäb.	-			+	sehr gut, <i>Hafnia alvei</i> 1	
D	groß, erhaben. weißlichgelb	groß, grauweiß, glänzend	(-), kl. kurze Stäb.	-			+		
D	kl., trocken, flach, bläulich	groß, gräulich-weiß, glänzend	(-), kl. kurze Stäb.	-		O/F	+	n.id. wenn gel(-), dann <i>Salm. choleraesuis</i> oder <i>Hafnia alvei</i> 2	(+) dunkellila, kl kurze Stäb, Kommas
D	kl., erhaben, roter als Nr. 3	groß, gräulich-weiß, glänzend	(-) kurze kl. Stäb.	-			+		
BL	groß, erhaben, weißlich-gelblich	groß, gelblich, feucht	(-) kl. kurze Stäb.	-			+		(+) dunkellila, kl kurze Stäb, Kommas
BL	groß, flach, mehrer Ringe hintereinander	mittelgroß, dicht, weiß, glänzend	(-) kl. kurze Stäb.	-			+	gut, <i>Escherichia vulneris</i>	(+) dunkellila, kl kurze Stäb, Kommas
H	2 mm, weinrot, leicht glänzend	trocken, dichtere Mitte, groß	(-) kl. kurze Stäb.	-			+		(+) lila, kurz, fast kokkoide Stäb
H	2 mm, lila, Ringe, trocken	kl., grauweiß, glänzend	(-) kl. kurze Stäb.	-			(+)		
D	hellrosa-weißlich, groß, unregelmäßiger Rand, feucht	mittelgroß, hämolytisch, grauweiß	(-) dünne Stäb. länglich	+			+		
D	dunkelrot, groß, flach, unregelmäß. Rand, trocken	groß, hämolytisch, feucht, gelb-grau	(-) dünne Stäb. länglich	+			(+)		(-) rosalila, zarte Stäb, etwas länger als Nr. 10
D	mittelgroß, rosa-weiß, erhaben, feucht	starke Hämolyse	(-) dünne kurze Stäb.	+			+	gut, <i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	(+) lila kurze dünne Stäb
D	groß, vulkanartig, unregelmäß., trocken, lila	mittelgroß, grauweiß, glänzend	(-) kokkoide Stäb	-			+	ungenügend, <i>Salm. choleraesuis</i>	(-) rosalila, kurze fast runde Stäb
D	kleiner, erhaben, rot, feucht rund	mittelgroß, grauweiß, glänzend	(-)winzige Kokken	-		O/F			
D	gelb, groß, erhaben	klein, hellgrau, glänzend	(-) kurz Stäb.	-			-	ungenügend, 0 % Mob: <i>Hafnia alvei</i> 2; 95 % Mob: <i>Salm. choleraesuis</i>	(+) lila, kurze fast kokkoid
D	flach, rot, groß,	klein, hellgrau, glänzend	(-) winzige Stäb.	-			+		
D	milchig, rosa, erhaben, schleimig	mittelgroß, weißgrau glänzend	(-) kurze Stäb.	-			-	sehr gut, <i>Hafnia alvei</i> 1	(+) lila, kurz etw. länglicher als 4D6
D	gelb, groß, erhaben	weißgrau, kleiner, glänzend	(-) kurze Stäb.	-			-		
D	flach lila	weißgrau, kleiner, glänzend	(-) kurze Stäb.	-		O/F	+	ungenügend <i>Salm. choleraesuis</i>	(-) dunkellila, fast runde Stäb

Tabelle A E-17: Bestimmung der Gesamtkeimzahl (GKZ), der Pseudomonaden-Keimzahl und der spezifischen Verderbskeime (specific spoilage organism SSO) in log KbE/g im Darm von Zandern

DARM	Fische	Lagerungstage		
		1	7	11
<b>GKZ</b>	1	3,30	3,67	5,66
	2	2,00	3,30	5,11
	3	2,00	3,70	5,58
	4	3,53	3,41	4,15
	5	3,30	4,01	5,15
	<b>MW</b>	<b>2,83</b>	<b>3,62</b>	<b>5,13</b>
	<b>StAbw.</b>	<b>0,76</b>	<b>0,28</b>	<b>0,60</b>
<b>Pseudom.</b>	1	2,00	2,00	5,30
	2	2,00	2,00	4,85
	3	2,00	3,30	5,24
	4	3,30	3,39	3,82
	5	2,00	3,30	4,81
	<b>MW</b>	<b>2,26</b>	<b>2,80</b>	<b>4,80</b>
	<b>StAbw.</b>	<b>0,58</b>	<b>0,73</b>	<b>0,59</b>
<b>SSO</b>	1	2,00	3,54	4,65
	2	2,00	3,30	4,19
	3	2,00	3,30	4,54
	4	2,00	3,46	4,00
	5	2,00	3,30	4,13
	<b>MW</b>	<b>2,00</b>	<b>3,38</b>	<b>4,30</b>
	<b>StAbw.</b>	<b>0,00</b>	<b>0,11</b>	<b>0,28</b>

MW = Mittelwert, StAbw. = Standardabweichung



Tabelle A E-18: Bestimmung der Gesamtkeimzahl (GKZ), der Pseudomonaden-Keimzahl und der spezifischen Verderbskeime (specific spoilage organism SSO) in log KbE/cm<sup>2</sup> auf der Haut von nicht ausgenommenen und ungewaschenen Zandern

HAUT rund	Fische	Lagerungstage			
		1	7	11	14
<b>GKZ</b>	1	4,57	7,45	7,99	8,55
	2	4,61	6,69	8,13	8,31
	3	4,41	6,87	7,97	7,56
	4	3,95	7,67	7,81	8,12
	5	5,17	7,00	7,60	8,06
	<b>MW</b>	<b>4,54</b>	<b>7,14</b>	<b>7,90</b>	<b>8,12</b>
	<b>StAbw.</b>	<b>0,44</b>	<b>0,41</b>	<b>0,20</b>	<b>0,37</b>
<b>Pseudom.</b>	1	3,74	6,86	7,73	8,43
	2	3,86	6,17	7,04	8,10
	3	3,60	6,02	7,80	7,30
	4	3,30	6,63	7,46	7,97
	5	3,52	6,03	7,37	7,90
	<b>MW</b>	<b>3,60</b>	<b>6,34</b>	<b>7,48</b>	<b>7,94</b>
	<b>StAbw.</b>	<b>0,21</b>	<b>0,38</b>	<b>0,30</b>	<b>0,41</b>
<b>SSO</b>	1	3,98	6,61	7,36	7,53
	2	4,49	5,70	7,13	7,18
	3	3,30	5,55	7,21	6,79
	4	3,30	6,16	6,82	7,20
	5	3,74	5,56	6,78	7,08
	<b>MW</b>	<b>3,76</b>	<b>5,92</b>	<b>7,06</b>	<b>7,16</b>
	<b>StAbw.</b>	<b>0,50</b>	<b>0,46</b>	<b>0,25</b>	<b>0,27</b>

Tabelle A E-19: Bestimmung der Gesamtkeimzahl (GKZ), der Pseudomonaden-Keimzahl und der spezifischen Verderbskeime (specific spoilage organism SSO) in log KbE/cm<sup>2</sup> auf der Haut von ausgenommenen und gewaschenen Zandern

HAUT leer	Fische	Lagerungstage			
		1	7	11	14
<b>GKZ</b>	1	4,51	5,64	7,73	8,60
	2	4,57	5,98	6,87	8,42
	3	5,15	6,04	7,35	8,61
	4	3,88	5,67	7,73	8,59
	5	4,36	6,66	7,87	8,31
	<b>MW</b>	<b>4,49</b>	<b>6,00</b>	<b>7,51</b>	<b>8,51</b>
	<b>StAbw.</b>	<b>0,46</b>	<b>0,41</b>	<b>0,41</b>	<b>0,13</b>
<b>Pseudom.</b>	1	3,93	5,13	7,13	8,24
	2	3,77	5,40	6,64	8,18
	3	3,64	5,77	6,08	8,18
	4	3,30	5,21	6,96	8,44
	5	3,70	5,95	7,73	8,13
	<b>MW</b>	<b>3,67</b>	<b>5,49</b>	<b>6,91</b>	<b>8,23</b>
	<b>StAbw.</b>	<b>0,23</b>	<b>0,36</b>	<b>0,61</b>	<b>0,12</b>
<b>SSO</b>	1	3,30	4,30	6,39	7,18
	2	3,30	5,00	5,93	7,52
	3	3,54	5,06	6,54	7,37
	4	3,30	4,00	6,64	7,41
	5	3,30	6,39	6,44	7,36
	<b>MW</b>	<b>3,35</b>	<b>4,95</b>	<b>6,39</b>	<b>7,37</b>
	<b>StAbw.</b>	<b>0,11</b>	<b>0,92</b>	<b>0,27</b>	<b>0,12</b>

MW = Mittelwert, StAbw. = Standardabweichung

Tabelle A E-20: Ergebnisse der 3er MPN-Methode bei der Bestimmung von *Enterobacteriaceae* auf den 4 festgestellten positiven Zanderproben von Haut und im Darm von Zandern am Tag 7 der Lagerung

Verdünnung	Wachstum +	Oxidase -	Glucose +	Code und entsprechendes MPN/g oder cm <sup>2</sup>
-1	1	1	1	1 0 0
-2	0	0	0	0,36 MPN/g oder cm <sup>2</sup>
-3	0	0	0	(Konfidenzintervall 0,02 bis 1,70 bei 95 %)
-1	3	0	0	0 0 1
-2	3	0	0	0,30 MPN/g oder cm <sup>2</sup>
-3	3	1	1	(Konfidenzintervall 0,01 bis 0,95 bei 95 %)
-1	3	1	0	0 1 0
-2	3	1	1	0,30 MPN/g oder cm <sup>2</sup>
-3	3	0	0	(Konfidenzintervall 0,01 bis 1,00 bei 95 %)
-1	3	0	0	0 2 0
-2	3	2	2	0,62 MPN/g oder cm <sup>2</sup>
-3	3	0	0	(Konfidenzintervall 0,12 bis 1,70 bei 95 %)

Tabelle A E-21: Differenzierung von verschiedenen auf VRBG gewachsenen *Enterobacteriaceae*-verdächtigen Isolaten aus Haut- und Darmproben von Zandern

Herkunft	Nr.	auf VRBG	auf Blutagar	Gramfärbung	Ox.	Kat.	O/F	ONPG
D	1	weißlich, schleimig, Mitte gelblich	gräulich weiß, leichte Hämol.	gram- Stäbchen	-	+	-	+
D	2	gr. dunkellila, trocken, leicht erhaben, dropsform	blasser, kleiner, erhaben glänzend, leicht gelblich	gram- Stäbchen	+	+	F	+
D	3	trocken, dunkellila, erhaben	weiß, schleimig, groß, glänzend	gram- Stäbchen	+	+	F	+
HL	5	gelb in Mitte, schleimig, Geruch: nach Alkohol, sauer	klein, weißlichgrau, leichte Hämol.	gram- Stäbchen	-	+	-	+
HV	6	flach, trocken, dunkelrosa, dropsform (heller als Nr 2)	gelblich weiß, keine Hämol.	gram- Stäbchen	-	+	OF	+
HV	7	schleimig, rosa Knopf,	starke Hämol.	gram- Stäbchen	+	+	OF	+
HV	8	schleimig, rosa Knopf,	starke Hämol.	gram- Stäbchen	+	+	OF	+
HV	9	pink, größer als Nr. 8, glänzend	Hämol.	gram- Stäbchen	+	+	OF	+
HV	10	schleimig, rosa gelber Hof, rosa Knopf	weißlich gelb, starke Hämol.	gram- Stäbchen	+	+	OF	+

Herkunft	Nr.	Bew.	Klgl.	ADH	ODC	LDC	VP	Api 20 E	0 % NaCl.	1 % NaCl	3 % NaCl	6 % NaCl	8 % NaCl	10 % NaCl
D	1	-	g/org	-		-	+	ungenügende Diff.	(+)	-	-	-	-	-
D	2	-	g/org	-	-	-	-	nicht identifizierbar	-	+	+	(+)	-	-
D	3	-	g/org	-	-	-	-	nicht identifizierbar	(+)	+	+	(+)	-	-
HL	5	-	g/org			-	-	ungenüg. <i>Sphmon. paucimobilis</i>	+	+	+	(+)	-	-
HV	6	+	r/g	-	-	-	-	<i>Enterobacter agglomerans</i> 5	+	+	+	+	-	-
HV	7	+	r/g	+	-	-	+	<i>Aeromonas salmonicida</i> (gut)	+	+	+	-	-	-
HV	8	+	r/g	+	-	-	+	<i>Pasteurella multocida</i>	+	+	+	-	-	-
HV	9	+	r/g	+	-	-	+	<i>Pasteurella multocida</i>	+	+	+	-	-	-
HV	10	+	r/g	+	-	-		<i>Pasteurella multocida</i>	+	+	+	-	-	-

D = Darm, H = Haut, L = leer, V = voll, Bedeutung der Abkürzungen für biochemische Differenzierungsreaktionen siehe Tabellen A M 1 bis M 3.

Tabelle A E-22: Zander, Biochemische Differenzierung von *Vibrio*- und *Aeromonas*-verdächtigen Isolaten der ersten und zweiten Anreicherung von Hauttupferproben in alkalischem Peptonwasser, ausgestrichen auf TCBS-Agar und RYAN-Agar

Nr.	Oxidase	Kligler	O 129	ON PG	Gramfärbung	Aussehen auf Blutagar	API 20E
<b>1. Anreicherung, TCBS-Agar</b>							
1	+	r/g, H <sub>2</sub> S	R	(+)	gram- Stäb. z.T Ketten	leicht vergrün. Hämolyse	
2	+	r/g	R	+	gram- Stäb., kurz, dick	leicht Hämolyse	
3	-	r/g		-		sehr klein	
4	-	r/g		-		sehr klein	
5	+	Orange	S	(+)			<i>Ps. spp. fluoreszens</i>
6	+	Orange	S	-			<i>Ps. spp. putida</i>
7	-	orange		-		sehr klein, hell	
8	-	r/g		-		sehr klein	
9	-	orange		-	gram-, kokkoide Stäb.	sehr klein	<i>Aeromonas salmonicida</i>
10	-	r/g		-	gramlabile kokkoide Stäb.	sehr klein	
11	-	r/g		-		leicht Hämolyse	
12	-	r/g		-		leichte Hämolyse	
13	-	r/g		-		sehr klein	
14	-	r/g		-		sehr klein	
15	-	r/g		-		sehr klein	
16	+	R/g	R	+	gram- Stäb. kurz dick	leichte Hämolyse	<i>Pasteurella</i> spp.
17	+	Orange	S	+	gram-, zarte krumme. Stäb.	Hämolyse	<i>Pseudomonas</i> spp
<b>2. Anreicherung, TCBS-Agar</b>							
18	-	r/g		-		sehr klein	
19	-	r/g		-		sehr klein	
20	-	r/g		-		sehr klein	
21	-	r/g		-		sehr klein	
22	(+)	r/g	R	-	gram- kurze Stäb.	sehr klein	
23	-	r/g		+	gramlabile Stäb., lang	groß, weich, feucht, Hämolyse	nicht identifizierbar
24	-	r/g		+		"	
25	-	r/g		(+)		"	
26	-	r/g		-		sehr klein	
27	-	r/g		-		sehr klein	
28	-	r/g		-		sehr klein	
29	-	r/g		-		klein	
30	-	r/g		-		groß	
<b>1. Anreicherung, RYAN-Agar</b>							
31	+	R/g	r	(+)	gram- kurze Stäb.	Vergrünende Hämolyse	<i>Vibrio hollisae</i>
32	+	R/g	r	+	gram- kurze Stäb.	Starke Hämolyse	<i>Pasteurella multocida</i>
33	+	R/G	r	-	gram- kurze Stäb.	Vergrünende Hämolyse	
34	+	R/g	r	+		Hämolyse	

Nr.	Oxidase	Kligler	O 129	ON PG	Gramfärbung	Aussehen auf Blutagar	API 20E
35	+	R/g	r	+		Hämolyse, schwach grün	
36	+	R/g	r	+		Hämolyse	
37	+	R/g	r	+		Vergrünende Hämolyse	
38	+	R/g	r	+		Vergrünende Hämolyse	
39	+	R/g	r	+		Vergrünende Hämolyse	
40	+	R/g	r	+		Vergrünende Hämolyse	
41	+	R/g	r	+		Hämolyse	
42	+	R/g	r	+		Hämolyse	<i>Pasteurella multocida</i>
43	+	R/g	r	+		Hämolyse	
44	+	R/g	r	+		Vergrünende Hämolyse	
45	+	R/g	r	+		Vergrünende Hämolyse	
46	+	R/g	r	+		Vergrünende Hämolyse	<i>Vibrio hollisae</i>
47	+	R/g	r	+		Vergrünende Hämolyse	
48	+	R/g	r	+		Vergrünende Hämolyse	
49	+	R/g	r	+		Vergrünende Hämolyse	
50	+	R/g	r	+		Hämolyse	
<b>2. Anreicherung, RYAN-Agar</b>							
51	-	r/g H <sub>2</sub> S		+	gram- kurze Stäb.	Vergrünende Hämolyse	<i>Citrobacter freundii</i>
52	-	r/g H <sub>2</sub> S		+		Vergrünende Hämolyse	
53	-	r/g		+		Vergrünende Hämolyse	
54	-	r/g H <sub>2</sub> S		+		Vergrünende Hämolyse	<i>Enterobacter amnigenus 2</i>
55	-	g/g		+	gram- Stäb.	Vergrünende Hämolyse	<i>Enterobacter amnigenus 2</i>
56	-	g/g		+		Vergrünende Hämolyse	
57	-	g/g		+		Vergrünende Hämolyse	
58	-	g/g H <sub>2</sub> S		+	gram- Stäb.	Vergrünende Hämolyse	<i>Citrobacter freundii</i>
59	+	r/g	r	+	gram- kurze Stäb., zart	Vergrünende Hämolyse	
60	+	r/g	r	+		Vergrünende Hämolyse	
61	-	g/g		+		Vergrünende Hämolyse	<i>Enterobacter amnigenus 2</i>
62	-	g/g		+		Vergrünende Hämolyse	

Tabelle A E-23: Zander, Differenzierung von Isolaten aus Darm- und Bauchlappenproben; Lagerungs-Tag 1: Fische 1 bis 5; Lagerungs-Tag 8: Fische 26 bis 30; Untersuchung auf Clostridien, Kat. = Katalasereaktion

Tag 1	Trübung	Schwärzung	Gasbildung	Wachstum auf Blut aerob	Wachstum auf Blut anaerob	Kat. aerob	Kat. anaerob	Kat. 2.Ausstrich aerob	Kat. 2.Ausstrich anaerob
D1a	(+)	-	-						
D1b	+	-	-	-	-				
D2a	-	-	-						
D2b	-	-	-						
D3a	-	-	-						
D3b	(+)	-	-	-	-				
D4a	+	-	-	+	+	-	-	-	-
D4b	+	-	-	+	+	-	-		
D5a	+	-	-	+	+	-	-	-	-
D5b	+	-	(+)	+	+	+	+		
B1a	+	-	(+)	+	+	-	-	-	-
B1b	+	+	+	+	+	+	-	-	-
B2a	(+)	-	((+))	+	+	+	-	+	+
B2b	-	-	-						
B3a	+	-	-	+	+	+	-	-	-
B3b	+	-	((+))	+	+	+	+		
B4a	-	-	-						
B4b	+	-	-	+	+	+	+		
B5a	(+)	-	-	-	-				
B5b	+	-	((+))	+	+	+	+		
Cl. perfr.	+	+	+		+		-		

Tag 8	Trübung	Schwärzung	Gasbildung	Wachstum auf Blut aerob	Wachstum auf Blut anaerob	Kat. aerob	Kat. anaerob	Kat. 2.Ausstrich aerob	Kat. 2.Ausstrich anaerob
D26a	+	-	(+)	+	-	-			
D26b	(+)	-	(+)	+	-	+			
D27a	+	-	(+)	+	+		-	+	+
D27b	+	+	(+)	+	+	+	-	-	-
D28a	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D28b	+	-	+	+	+	+	-	+	+
D29a	+	+	+	+	+	+	+		
D29b	+	-	+	+	+	+	+		
D30a	(+)	-	((+))	-	-				
D30b	+	-	-	-	-				
B26a	+	-	-	-	-				
B26b	+	-	((+))	-	(+)		-		
B27a	+	-	((+))	+	-	-	-		
B27b	+	-	(+)	+	-	+	-	+	+
B28a	+	-	+	+	-	+	+		
B28b	+	+	-	+	+				
B29a	+	-	-	+	-	+			
B29b	+	-	-	+	+	-	+		
B30a	+	-	(+)	+	+	-	+		
B30b	+	-	(+)	+	+		+		

**Nährmedienzusammensetzung:****0,1% Peptonkochsalzlösung**

Pepton	1,0 g
NaCl	8,5 g
Aqua dest.	1000 ml

**0,1% Peptonkochsalzlösung +Agar in Verdünnungsröhrchen für Tropfplattenverfahren**

Pepton	1,0 g
NaCl	8,5 g
Agar	0,75 g
Aqua dest.	1000 ml

**1% gepuffertes Peptonwasser für Voranreicherung von Salmonellen**

Pepton	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodekahydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	9,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,5 g
Aqua dest.	1000 ml
pH 7,0	

**PC-Agar: Plate-Count-Nährboden, (Oxoid CM 325)**

Caseinpepton-Hefeextrakt-Glucose-Agar

Caseinpepton	5,0 g
Hefeextrakt	2,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	9,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH 7,0+/- 0,2	

**ECD-Agar: Escherischia-Coli-Direkt-Agar**

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	20,0 g
Lactose	5,0 g
Tryptophan	1,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Gallensalze	1,5 g
Di-Kaliumhydrogenphosphat $\text{K}_2\text{HPO}_4$	4,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5 g
4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid	0,07g
Agar	12 g
Aqua dest.	1000 ml
pH 7,0+/- 0,1	

**VRBG-Agar: Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar nach Mossel** (Merck Art.Nr.10275)

Pepton aus Fleisch	7,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Glucose	10,0 g
Gallesalzmischung	1,5 g
Neutralrot	0,03 g
Kristallviolett	0,002 g
Agar	12,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH 7,4+/-0,1	

**SCA-Agar: Sulfit-Cycloserin-Azid-Agar** (Oxoid CM587 Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Selektivnährboden)

Tryptose	15,0 g
Pepton aus Sojamehl	5,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Fleischextrakt	5,0 g
Glucose	2,0 g
Ammoniumeisen(III)-citrat	0,5 g
Natriummetabisulfit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )	0,5 g
Agar	12 g
Aqua dest.	1000 ml
pH 7,4+/-0,2	

**Cycloserin-Azid-Lösung** (1ml pro 100ml Agar)

D-Cycloserin	1,5 g
Natriumazid	0,25 g
Aqua dest.	50 ml

**GSP-Agar: Pseudomonaden-Aeromonaden-Selektivagar nach Kielwein,**  
(Merck Art-Nr. 1.10230.0500)

Natrium-L(+)-glutamat	10,0 g
Stärke, löslich	20,1 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,0 g
Magnesiumsulfat	0,5 g
Phenolrot	0,36 g
Agar	12,0 g
Aqua dest	1000 ml
pH 7,2+/-0,2	
zusätzlich: Penicillin-G-Natrium 100.000I.E. ( Merck 1.06993.0010)	



**Ryan-Agar: Aeromonas-Selektivnährboden nach Ryan** (Oxoid CM 833)

Proteose-Pepton	5,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
L-Lysin	3,5 g
L-Arginin	2,0 g
Inosit	2,5 g
Lactose	1,5 g
Sorbit	3,0 g
Xylose	3,74 g
Gallensalze Nr.3	3,0 g
Natriumthiosulfat	10,67 g
Natriumchlorid	5,0 g
Eisen(III)-ammoniumcitrat	0,8 g
Bromthymolblau	0,04 g
Thymolblau	0,14 g
Agar	12,5 g
Ampicillin-Selektiv-Supplement	2,5 mg
Aqua dest.	500 ml
pH 8,0 +/- 0,1	

**FRASER-Listeria-Selektiv-Anreicherungsbouillon-Basis**(Merck Art.Nr.1.10398.0500)

erstes selektives Anreicherungsmedium 1/2 -Fraser-Bouillon

Protease Pepton	5,0 g
Pepton aus Casein	5,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Fleischextrakt	5,0 g
Natriumchlorid	20,0 g
di-Natriumhydrogenphosphat	12,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,35 g
Äskulin	1,0 g
Lithiumchlorid	3,0 g
Aqua dest	1000 ml
pH 7,2 +/- 0,2	

ein Volumenteil Lithiumchlorid und jeweils ein halbes Volumenteil an Acriflavin und Nalidixinsäure

**FRASER-Listeria-Selektiv-Anreicherungsbouillon-Basis**

zweites selektives Anreicherungsmedium mit vollständigen Konzentrationen an selektiven Agentien; Zusammensetzung: siehe oben

**Zusatz von Fraser-Listeria-Supplement** (Merck Art.Nr.1.10399.0001)

Ammoniumeisen(III)-citrat	5 g
Selektivsupplement:	
Acriflavin	0,125 g
Nalidixinsäure	0,10 g

**OXFORD-Listeria-Selektivagar (Basis)** (Merck Art.Nr.1.07004.0500)

Peptone	23,0 g
Stärke	1,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Agar	13,0 g
Äskulin	1 g
Ammoniumeisen(III)-citrat	0,5 g
Lithiumchlorid	15 g
Aqua.dest	1000 ml
pH 7,0 +/- 0,2	

**OXFORD-Listeria-Selektivsupplement** (Merck Art.Nr. 1.07006.0001)

Cycloheximid	400 mg
Colistinsulfat	20 mg
Acriflavin-Hydrochlorid	5,0 mg
Cefotetan	2,0 mg
Fosfomycin	10 mg
Ethanol	5 ml
Aqua dest.	5 ml

**PALCAM-Listeria-Selektivagar (Basis) nach Van Netten**(Merck Art.Nr. 1.11755.0500)

Peptone	23,0 g
Stärke	1,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Agar	13 g
D-Glucose	0,5 g
D-Mannit	10,0 g
Äskulin	0,8 g
Ammoniumeisen(III)-citrat	0,5 g
Phenolrot	0,08 g
Lithiumchlorid	15,0 g
Aqua dest	960 ml
pH 7,2 +/- 0,2	

**PALCAM-Listeria-Selektivsupplement** (Merck Art.Nr. 1.12122.0001)

Polymyxin-B-sulfat-Lösung	10 ml
Natriumceftazidim-Pentahydrat-Lösung	20 ml
Acriflavin-Hydrochlorid-Lösung	10 ml

**TSYEA Trypton-Soja-Hefe-Extrakt-Agar**

Trypton	17,0 g
Sojapepton	3,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Dikaliumhydrogenphosphat	2,5 g
Glukose	2,5 g
Hefeextrakt	6,0 g
Agar	12,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH 7,3+/- 0,2	

**TSYEB Trypton-Soja-Hefe-Extrakt-Bouillon**

Trypton	17,0 g
Sojapepton	3,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Dikaliumhydrogenphosphat	2,5 g
Glukose	2,5 g
Hefeextrakt	6 g
Aqua dest.	1000 ml
pH 7,3+/- 0,2	

**Bluragar-Basis Nr.2+ defibriniertes Schafblut** (OXOID CM 271)

Fleischpepton	15 g
Leberabbauprodukt	2,5 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	5 g
Agar	12 g
Aqua dest.	1000 ml
defibriniertes Schafblut: 5ml bis 10ml in 100ml Grundmedium	

**Kohlenhydrat-Bouillon**

(L-Rhamnose oder D-Xylose)

Proteose-pepton	10 g
Fleischextrakt	1 g
Natriumchlorid	5 g
Bromkresolpurpur	0,02 g
Kohlenhydrat	5 g
Aqua dest.	1000 ml

**Beweglichkeitsmedium für Listeriennachweis**

Caseinpepton	20,0 g
Fleischpepton	6,1 g
Agar	3,5 g
Aqua dest.	1000 ml
pH 7,3 +/- 0,2	

---

**Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliades**
**Lösung A**

Trypton oder Sojapepton	4,5 g
Natriumchlorid	8,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,6 g
Aqua dest.	1000 ml

**Lösung B**

Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	400 g
Aqua dest.	1000 ml

**Lösung C**

Malachitgrün-Oxalat	0,4 g
Aqua dest.	100 ml

**Vollständiges Medium**

Lösung A	1000 ml
Lösung B	100 ml
Lösung C	10 ml
pH 5,2	

**Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar (BPLS) nach Edel und Kampelmacher (Merck Art.Nr. 1.07237.0500)**

Pepton aus Fleisch	5,0 g
Pepton aus Casein	5,0 g
Fleischextrakt	5,0 g
Natriumchlorid	3,0 g
di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	2,0 g
Lactose	10,0 g
Saccharose	10,0 g
Phenolrot	0,08 g
Brillantgrün	0,0125g
Agar	12,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH 6,9+/-0,2	

**XLD-Agar Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar**, (Merck Art.Nr. 1.05287.0500)

Hefeextrakt	3,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
D(+)-Xylose	3,5 g
Lactose	7,5 g
Saccharose	7,5 g
L(+)-Lysin	5,0 g
Natriumdesoxycholat	2,5 g
Natriumthiosulfat	6,8 g
Ammoniumeisen(III)-citrat	0,8 g
Phenolrot	0,08 g
Agar	13,5 g
Aqua dest.	1000 ml
pH 7,4+/- 0,2	

**O/F-Agar-Basis** (OXOID Art.-Nr. CM 883)

Caseinpepton	2,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Dikaliumhydrogenphosphat	0,3 g
Bromthymolblau	0,08 g
Agar	2,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH 6,8 +/- 0,2	

+ sterilfiltrierte Lösung von Glucose, Lactose oder Saccharose

9,4 g in Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. Zu je 100 ml abfüllen und 15 min bei 121°C autoklavieren. Abkühlen lassen und jeweils 10 ml einer 10%-igen, sterilfiltrierten Lösung von Glucose, Lactose oder Saccharose zufügen. Zu 5 ml in Röhrchen abfüllen.

**AHM (Aeromonas hydrophila-Medium)**

Proteose-Pepton	5 g
Hefeextrakt	3 g
Trypton	10 g
L-Ornithin.HCl	5 g
Mannit	1 g
Inosit	10 g
Natriumthiophosphat	0,4 g
Eisen(III)-ammoniumcitrat	0,5 g
Bromkresolpurpur	0,02 g
Agar	3 g
Aqua dest.	1000 ml
pH 6,7 +/- 0,2	

Zu 5 ml in Röhrchen abfüllen, autoklavieren und als Hochschicht erkalten lassen.

**Äsculin-Bouillon**

Fleischpepton	10 g
Äsculin	1 g
Eisen-(II)-citrat (grün)	0,3 g
Aqua dest.	1000 ml

pH 7,4 +/- 0,1

Zu 4 ml in Röhrchen abfüllen, autoklavieren.

**Für****-Gas aus Glucose****-Salicinfermentation****-Arabinosehydrolyse:****Hottinger-Bouillon** (Grundsubstrat)

NaCl	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,24 g
Proteose-Pepton	10 g
Aqua dest.	1000 ml
Indikator: 0,1%-ige Bromthymolblaug.	40 ml

pH 7,5 +/- 0,1

+ 1% der entsprechenden Substanz (**Glucose, Salicin, Arabinose** )

Zu 5 ml in Röhrchen abfüllen, autoklavieren; in die Glucose enthaltenden Röhrchen zum Nachweis der Gasbildung Durham-Gärröhrchen geben.

**Voges-Proskauer-Bouillon**, MR-VP-Bouillon Basis (Merck Art.Nr. 5712)

Pepton aus Fleisch	7,0 g
Glucose	5,0 g
Dikaliumhydrogenphosphat	5,0 g
Aqua dest.	1000 ml

pH 6,9 +/- 0,1

Auflösen, zu 5 ml in Reagenzröhrchen abfüllen, autoklavieren.

**Lysindecaboxylase(LDC)-Bouillon**

Bacto-Hefeextrakt	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g
Glucose	1,5 g
L-Lysinmonohydrochlorid(Merck Art.Nr.5700)	20 g

1%-ige Bromkresolpurpur.Lsg. 4 ml

Aqua dest. 1000 ml

pH 6,8 +/- 0,2

Zu 2 ml in Röhrchen abfüllen, mit Paraffinöl überschichten und autoklavieren.

## **DANKSAGUNG**

Dem Bundesministerium für Gesundheit bzw. Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung der Studie im Rahmen des Forschungsvorhabens.

Bei allen, die mir bei der Vorbereitung und Durchführung der Untersuchungen hilfreich zur Seite standen, bedanke ich mich ganz herzlich.

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Ekkehard Weise für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, das Vorhaben im Fachbereich 3, Hygiene und Mikrobiologie der Lebensmittel und Bedarfsgegenstände des BgVV durchzuführen und Herrn Prof. Dr. Kurt Schreckenbach für die Genehmigung des Themas sowie für die freundliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ganz besonders danken möchte ich Frau Dr. Edda Bartelt für Ihren Einsatz sowohl im Theoretischen als auch in praktischen Belangen und für die intensive wissenschaftliche Betreuung der vorliegenden Arbeit. Desgleichen danke ich Frau Dr. Stefanie Banneke, deren Ideen, Hinweise und Korrekturen eine unentbehrliche Hilfe waren, die stets ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme hatte und mir durch Motivation und Ansporn über manche schwierige Situation hinweghalf.

Dank gebührt weiterhin Frau Christiane Buhler und Frau Petra Vogt für die unermüdliche Hilfsbereitschaft im Labor und für die Gewinnung des umfangreichen Datenmaterials.

Herrn Prof. Dr. Harald Kolb danke ich für die Bereitstellung der Räume der Fleischtechnologie und des Sensorikraumes sowie für die investierte Zeit bei der Sensorikprüfung und Herrn Michael Hermessen für die Hilfe bei der Lagerung der Fische und der Durchführung der Sensorikuntersuchungen. Weiterhin danken möchte ich den geduldigen Mitarbeitern des Sensorikteams, Frau Dr. Elke Henrion, Frau Hedwig Mihajlovic, Frau Ulrike Kämpe, Frau Katrin Nold, Herrn Dr. Ralf-Peter Pund sowie Frau Chi-Yeun Cheung und Frau Christina Weber für hilfreiche Tipps bei der Statistik und der Datenverarbeitung. Herzlich bedankt seien des weiteren Frau Dr. Ingrid Schütt-Abraham für die Beschaffung des CO<sub>2</sub>-Betäubungsgerätes und ihr Engagement bei der Durchführung der Betäubung sowie Frau Elke Bauer für die Hilfe bei der Übersetzung der englischen Zusammenfassung.

Allen Mitarbeitern des Fachbereiches 3 des BgVV schließlich besten Dank für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit und für die schöne Zeit am BgVV.